

BASTA CELIACHIA... ANCORA CELIACHIA!

a cura di TANIA GERARDUZZI E ALESSANDRO LENHARDT

Scuola di Specializzazione in Pediatria, Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Questo Focus è stato realizzato utilizzando i contributi presentati al convegno di Trieste del gennaio 2004 sulla malattia celiaca. Come esplicitamente diceva il titolo del convegno (Basta celiachia... ancora celiachia!), già allora pensavamo di... non poterne più di tutta la storia. Tutto quanto fu detto e discusso in quella occasione è ancora attualissimo e meritevole (almeno a noi pare così) di essere divulgato anche a un anno di distanza. È vero però che, a dimostrazione di quanto siano in continuo divenire le conoscenze sulla malattia celiaca, nuove problematiche e nuovi dibattiti si sono

aperti nel tempuscolo che ci separa da quel congresso. Ed è per questa ragione che abbiamo ritenuto che debba far parte integrante di questo stesso Focus il contributo critico (estemporaneo, tanto letterario nella forma quanto rigoroso nei contenuti scientifici) di Luigi Greco sul tema della "pillola" per la celiachia cui i "media" hanno dato ultimamente tanta risonanza. Così come ci sembra già il momento di annunciare il prossimo convegno sulla malattia celiaca che si terrà a Trieste il 20 gennaio 2006 e che sarà, come ormai da tradizione, organizzato con l'insostituibile aiuto dell'Eurospital.

LA FACCIA E... L'ANIMA DELLA CELIACHIA

Trieste, Area di Ricerca di Padriciano, 20 gennaio 2006

9.00-9.15	I SESSIONE Celiachia: c'è ancora qualcosa da sapere?		Esperienze sul campo: • Trieste • Asolo • Brasile • Africa
9.15-9.45	Celiachia a colpo d'occhio. Ovvero la "facies" celiaca	13.15-14.30	Pranzo senza glutine
9.45-10.15	Pelle, osso, muscoli e... nervi: quattro casi per entrare nel discorso	14.30-16.00	L'anima della celiachia ovvero a che punto siamo con la ricerca • Celiachia e autoimmunità: modelli animali • Il topo che fa gli antitransglutaminasi • L'anatomia del celiaco vista attraverso gli autoanticorpi • Celiachia e "regolatori" dell'immunità • Terapia in pillole e... altre storie
10.15-11.30	(compresa discussione) Che cosa è la celiachia 1: impariamo dalla dermatite erpetiforme Che cosa è la celiachia 2: impariamo dal neurologo e dall'immunologo Celiachia "ridotta all'osso"	16.00-16.15	Tè e succo di frutta
11.30-11.45	Caffè e biscotti senza glutine	16.15-17.30	TAVOLA ROTONDA Legiferare sulla celiachia: tra garanzie per la salute e sottolineature di malattia Esperienze europee a confronto <i>Intervengono i rappresentanti delle Associazioni della Celiachia di diversi Paesi europei</i>
11.45-13.15	II SESSIONE Celiachia "pronta per l'uso" ovvero: quanto rapida può essere la diagnosi • Una goccia di sangue • Una goccia di siero • Una goccia di saliva		

Cari ragazzi...

ALESSANDRO VENTURA

Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo,
IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

A prima vista un nuovo congresso sulla celiachia può sembrare proprio di troppo. Le cose che abbiamo imparato su questa malattia solo negli anni più recenti ci appaiono ancora così nuove, così diverse da quello che sapevamo prima, così rivoluzionarie sul piano teorico e nello stesso tempo così utili su quello pratico che veramente avremmo voglia di fermarci un po', semplicemente a metterle in atto e a verificare direttamente quanto siano vere.

È di fatto solo da pochi anni che abbiamo imparato come la celiachia sia una condizione frequente, polimorfa sul piano clinico, da cercare e sospettare anche in assenza di sintomi gastroenterologici (...le molte facce della celiachia). E certamente è ancora quasi una novità che la patogenesi della malattia sia "di tipo autoimmune" o che se ne conoscano i fattori di predisposizione genetica. E, non posso negare, che chi è passato attraverso la storia travagliata della diagnosi della celiachia e delle tre biopsie si meraviglia ancora un po' che ora sia tutto così facile grazie alla disponibilità di test sierologici così sensibili e specifici.

Tutto questo è rimasto vero ma è in qualche modo è andato complicandosi proprio attraverso la continua implementazione della ricerca e della pratica sul campo della "nuova celiachia". Di fatto, se è comprovato che la celiachia viene oggi cercata (e correttamente diagnosticata) molto più spesso che in passato (e questo è il risvolto positivo di tutta la faccenda) è vero anche che più si sa e più si cerca, più ci troviamo davanti a situazioni "limite" mal definibili e, alla fine, ci sembra di essere più confusi di prima. A questo punto sentiamo in qualche modo l'esigenza di tornare sui nostri passi, di essere più schematici e più semplici.

Per introdurre questo incontro ho scelto tre punti critici, sostanziali, legati agli aspetti clinici della celiachia concreta ma dietro ai quali c'è una grande prospettiva di ricerca.

Il primo punto è il problema della storia naturale della celiachia nel soggetto asintomatico. È giusto o no in questi casi porre la diagnosi? Intervenire terapeutamente? Non possiamo infatti parlare di celiachia e non parlare anche dei soggetti celiaci, delle persone a cui tiriamo addosso una malattia pur se asintomatici. Molto importanti in quest'ambito sono i risultati ancora preliminari di un progetto di ricerca della regione Friuli-Venezia Giulia, frutto di una collaborazione tra il centro di Epatologia, la Clinica Pediatrica e il Dipartimento di Biologia dell'Università di Trieste. In questo studio (di tipo retrospettivo prospettico) è stato possibile verificare gli eventi di salute/malattia sopravvenuti in 10 anni in 3000 abitanti della cittadina di Cormons e di correlarli a dati di laboratorio disponibili (anche a posteriori) sui campioni di siero che erano stati raccolti. È stato così possibile verificare come soggetti celiaci non riconosciuti (EMA positivi), nei dieci anni dello studio, si siano ammalati (in particolare per anemia, patologie autoimmuni e di fegato) e abbiano fatto ricorso a visite e a

cure mediche e in particolare a esami endoscopici molto più frequentemente della popolazione EMA negativa. La celiachia, quindi, rappresenta un importante fattore di morbilità generico, e questo forse ci aiuta a rispondere ai nostri dubbi sul che cosa fare nel soggetto asintomatico.

Un secondo accento va posto sulla sempre vivace discussione in merito all'associazione tra diabete e celiachia. Rimane affascinante l'ipotesi che nel soggetto predisposto ad avere diabete mangiare glutine faccia male. A questo proposito quindi devo citare uno studio che davvero impressiona. Sono stati selezionati dei neonati con rischio genetico di sviluppare diabete e sono stati suddivisi in un gruppo che riceve glutine precocemente (nei

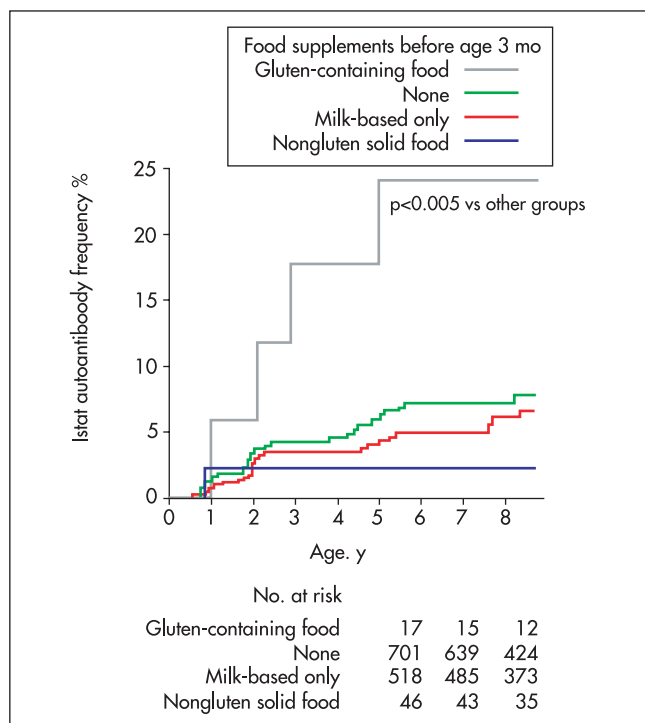


Figura 1. Età di introduzione del glutine e predisposizione al diabete in neonati a rischio (da voce bibliografica 1).

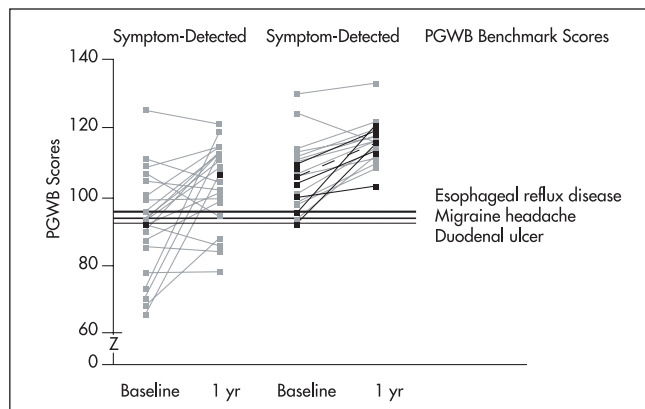


Figura 2. Qualità della vita percepita dopo l'inizio della dieta senza glutine (da voce bibliografica 2).

primi 3 mesi) e in un gruppo che lo riceve tardivamente¹. Gli Autori rivelano che si verifica significativamente meno diabete (positività degli ICA) nel secondo gruppo, pur trattandosi comunque di soggetti predisposti (*Figura 1*).

Un terzo e ultimo accento deve essere posto sulla qualità di vita del celiaco. Spesso il medico dimentica che curando una malattia introduce, con la diagnosi, un'etichetta della persona e impone una terapia dannosa o faticosa da fare. E di fatto qualcuno continua a sottolineare come la dieta senza glutine in un celiaco asintomatico rischi di apportare semplicemente un peggioramento della qualità della vita senza un vantaggio misurabile. Eppure alcune evidenze della letteratura sembrano dirci che qualcosa è realmente cambiato e che non dobbiamo più avere una visione così drammatica della dieta senza glutine. Il trend degli studi più recenti indica infatti che sia nei soggetti sintomatici che in quelli asintomatici la dieta senza glutine migliora la percezione della

qualità della vita² (*Figura 2*). Certo, altri studi sembrano ancora dimostrare il contrario; ma è possibile che la normalizzazione dell'essere celiaco, lo sviluppo di una società che inserisce come variabile normale il poter scegliere se mangiare o meno glutine, la diffusione e il rafforzamento dalle associazioni dei pazienti (come l'Associazione Italiana Celiachia, AIC) abbiano un ruolo determinante.

Bibliografia

1. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *JAMA* 2003;290:1771-2.
2. Mustalahti K, Lohiniemi S, Collin P, Vuolteenaho N, Laippala P, Maki M. Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. *Eff Clin Pract* 2002;5:105-13.

Curare con una "pillola"? Che ne pensa Telemaco, figliuolo di Ulisse?

LUIGI GRECO

Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II" di Napoli

Nel tempuscolo intercorso tra il meeting di Trieste e il tempo attuale, il popolo dei celiaci italiani ha visto sorgere un insperato interesse dei media, di ogni livello, verso il "problema celiachia", interesse guidato da un vessillo giornalistico da grande scoop: *c'è ormai, quasi pronta, una 'pillola' che 'cura' la celiachia*.

Qualsiasi partita di pallone ottiene sui quotidiani vessilli ben più credibili e meno superficiali. Non si tratta di "pure fandonie" ma di un pessimo livello di documentazione e interpretazione delle varie "pene libere" dei nostri media, che sembra non sappiano proporre i veri progressi della scienza senza scivolare nel miracolismo.

Ma... "Le passioni si calmano quando parla la virtù e la sapienza" ci consiglia Mentore, tutore di Telemaco.

Vediamo umilmente di interpretare senza infrangere le delicate speranze degli utenti.

TOMO I: Ove Telemaco, figliuolo di Ulisse, affronta i perigli del mare alla ricerca del padre

Eliminare pane e pasta dalla dieta quotidiana appare ai nuovi celiaci, e ancor più ai loro familiari, una ingiustizia insoppor-

tabile, deve trattarsi di una cosa transitoria, gli scienziati troveranno presto una soluzione... Lanciamoci nel mare periglioso alla ricerca della "pillola".

Eppure, lo sappiamo tutti, che l'uomo non ha affatto bisogno di pane, pasta, grano. Infine, si tratta dei cibi qualitativamente più scadenti, portati agli altari perché soluzione ai recenti secoli di miserie e carestie, ma ben superati ai giorni nostri. Molti dicono (anche intere nazioni): bisogna trovare la pillola perché fare la dieta è impossibile...

Ma basta un semplice ragionamento: una pillola, di qualsiasi tipo, servirebbe a farci mangiare tutti il grano, "contenendo" o "riducendo" più o meno gli effetti tossici che questo causa ai soggetti che hanno i geni predisponenti alla celiachia. È come affrontare la pioggia scrosciante con un ombrello di vimini: l'acqua passerà dai siti più impensati. Non conosciamo ancora infatti quali sono i meccanismi molecolari che causano nei celiaci, e non in altri, i gravi danni di una patologia autoimmune. E abbiamo mezzi rudimentali, tutti non specifici e di per sé pericolosissimi: sopprimere l'immunità innata, eliminare la risposta infiammatoria, controllare le citochine, modificare l'immunità cellu-

lo-mediata. Un peso enorme per l'equilibrio dei nostri sistemi di difesa. Sull'altro piatto della bilancia una dieta piacevole, ricca, più nutriente, semplice ed economica, già pronta oggi.

TOMO II: Ove Telemaco, figliuolo di Ulisse, subisce l'incanto della dea Calipso

Ma c'è per fortuna un grande sforzo per capire gli intimi meccanismi che portano solo i celiaci a reagire tanto male a una proteina alimentare. Da anni sappiamo che i celiaci che ingeriscono glutine hanno un aumento della permeabilità intestinale: la loro barriera intestinale si apre più facilmente al passaggio di zuccheri di diverse dimensioni. Un gruppo americano cerca da tempo di identificare una proteina, chiamata zonulina (*Box 1*), che potrebbe essere una "chiave" di apertura e chiusura dei passaggi tra le cellule intestinali. La loro speranza è che, bloccando l'azione di questa proteina, si possa bloccare il passaggio dei peptici tossici del glutine dal lume intestinale verso le cellule che scatenano la risposta immunitaria. La "pillola" in questo caso è un inibitore dell'azione della presunta "zonulina". Ma certamente le speranze concrete sono lontanissime: non si può attualmente bloccare solo il glutine e non gli altri nutrienti, e non si conoscono ancora i meccanismi molecolari e le strutture di questo complesso di proteine che controllano la permeabilità. In ogni caso questa "pillola" andrebbe data insieme al glutine e non potrebbe controllarne gli effetti sulla superficie cellulare degli enterociti. È infatti stato dimostrato che la maggior parte dei peptidi tossici del glutine passano direttamente per la superficie dell'enterocita e solo in piccolissima parte passano per le giunzioni tra le cellule.

Box 1 - L'AFFASCINANTE E DIFFICILE PERCORSO DELLA ZONULINA

Il vibrione del colera possiede una tossina, chiamata "ZOT" (*Zonula Occludens Toxin*), capace di aprire le giunzioni serrate tra le cellule dell'intestino umano e causare la ben nota profusa diarrea. Fasano (*J Cell Sci* 2000;113:4435-40) nel 2000 ha ipotizzato che questa tossina dovesse avere una proteina analoga nell'uomo, che chiamò zonulina, capace di controllare l'apertura e chiusura delle giunzioni serrate tra le cellule dell'epitelio intestinale. Nel 2001 ha identificato il recettore della ZOT in cellule umane (*FEMS Microbiol Lett* 2001;194:1-5) e ne ha studiato la possibile analogia con un recettore per la zonulina. Nel 2003 ha suggerito che la zonulina possa aprire le giunzioni serrate in risposta a un contatto con batteri, in modo da "lavare via" gli stessi batteri (*Gastroenterology* 2003;124:275). Nel 2003, insieme a ricercatori italiani, ha dimostrato che l'aggiunta di gliadina a cellule intestinali di ratto aumenta la permeabilità, modifica la struttura del citoscheletro ed è coincidente con un possibile rilascio di zonulina (*GUT* 2003;52:218-23).

Nel 2005 Berti, Not e Fasano hanno osservato che la zonulina era 35 volte più attiva nei ratti che sviluppano il diabete rispetto a quelli che non lo sviluppano: bloccando la zonulina, sono riusciti a ridurre l'incidenza del diabete nei ratti geneticamente predisposti (*Proc Natl Acad Sci* 2005;102:2916-21). Da qui la speranza che questa proteina, per ora identificata in modo preliminare, possa essere sensibile alla gliadina sulle cellule intestinali dei soggetti celiaci, in modo da permettere il passaggio di peptici tossici. In questo caso, purtroppo non verificato sperimentalmente (Heyman, *Gastroenterology* 2003;125(3):696-707), si potrebbe bloccare la zonulina per impedire il passaggio dei peptici tossici.

TOMO III: Ove Telemaco, figliuolo di Ulisse, apprende che l'uomo è ingegnoso per trovar ragioni che lo favoriscono, e rimuover quelle che lo condannano

Una soluzione più promettente è quella di agire sul glutine prima che venga in contatto con il soggetto celiaco, cioè tentare di "detossificare" il glutine. Si tratta in pratica di digerire il glutine in laboratorio prima di confezionare prodotti con fa-

rina di grano. Il metodo è attualmente disponibile, ma non è ancora proponibile come soluzione pratica. Il glutine predigerito è infatti un materiale poco adatto a confezionare pani e paste, perché perde la struttura tipica del glutine intatto, necessaria alla lievitazione e alla tenacità della pasta. (*Appl Environ Microbiol* 2004;70(2):1088-96).

Si è anche parlato di fare una "pillola"

che contenga gli speciali enzimi digestivi capaci di attaccare, nello stomaco del paziente celiaco, i peptici tossici del glutine in modo da ridurre la tossicità. Ma questa è ancora una soluzione "fantasiosa" che non ha sbocchi pratici.

TOMO IV: Ove Telemaco, figliuolo di Ulisse, scopre l'Eccellenza della Ragione

È un vero peccato non riuscire a distinguere i progressi della scienza nel campo della celiachia dalla presunta urgenza di soluzioni "a breve termine": questa confusione offusca i grandi recenti progressi e mortifica gli sforzi straordinari di tanti onesti ricercatori impegnati a far luce sulle cause genetiche e molecolari dell'intolleranza permanente al glutine.

Ora e in futuro esiste già una soluzione terapeutica straordinariamente semplice, economica, piacevole rispetto a qualsiasi "pillola". Ma bisogna sforzarsi di progredire nelle conoscenze per combattere la lunga serie di sofferenze e complicanze che il glutine causa a tanti soggetti celiaci. Bisogna combattere la sofferenza, la malattia autoimmune, non la scomodità; questa viene dopo.

E chi fa ricerca deve stare attento: ...i loro falli essendo meno scusabili di quelli dei particolari.

Da: *Le Avventure di Telemaco, figliuolo di Ulisse*. Francesco di Salignac della Motta Feneion, Maestro de' Serenissimi Principi di Francia, indi Arcivescovo di Cambrai ec. Nella Stamperia Abbaziana, in Napoli MDCCXCIII

La celiachia dal vero: dal bambino all'adulto filo conduttore è l'anemia

Un'anemia di famiglia

TANIA GERARDUZZI

Scuola di Specializzazione in Pediatria, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Francesca è una bambina di 7 anni con una storia di alvo frequente, con feci molli e puzzolenti. La mamma è molto preoccupata da quando la figlia non

gioca più perché dice di essere troppo stanca. D'accordo con il pediatra di base le fa eseguire alcuni esami ma l'emocromo nega la presenza di anemia. La mamma, ancora non convinta, la porta in ambulatorio gastroenterologico. Gli anticorpi EMA e anti-tTG risultano positivi.

Gianna è la mamma di Francesca, ha 45 anni e 12 anni prima aveva deciso di donare il sangue ma era stata scartata perché anemica. Aveva successivamente assunto alcuni cicli di ferro per bocca, ma successivi controlli avevano sempre confermato l'anemia iposideremica, oltre a evidenziare la presenza di una modesta ipertransaminasemia. Successivi approfondimenti per inquadrare il problema epatico non avevano evidenziato patologie specifiche. Successivamente, di fronte alla comparsa di importanti e diffusi

dolori ossei, il medico di base le ha prescritto una densitometria che ha rivelato un'osteoporosi avanzata. Dopo il riscontro di EMA e anti-tTG positivi nella figlia finalmente completiamo il puzzle e la signora Gianna risulta essere a sua volta celiaca.

Luisa è la sorella di Gianna, quindi zia di Francesca. È sempre stata anemica, lamentando importante spossatezza; nessun medico ha mai risolto il problema nonostante decine di analisi e di cicli di ferro per bocca. Non vorrebbe più farsi vedere da un medico, ma la diagnosi di sorella e nipote le ridanno speranza. Ha finalmente una risposta: risulta essere a sua volta celiaca.

Ma la storia di questa famiglia non finisce qui e in una specie di gioco degli specchi (*Figura 1*) entra anche Giulia, bambina di 7 anni, figlia di Luisa, nipote di Gianna e cugina di Francesca. Giulia è

stetica da sempre, da alcuni mesi si è come spenta, è molto pallida. Risulta EMA e anti-tTG positiva.

La biopsia conferma per tutti la presenza di atrofia intestinale.

La letteratura ci dice che, partendo dal laboratorio, si trova la celiachia nel 5% dei soggetti selezionati come anemici agli

screening laboratoristici/donatori di sangue^{1,3}. Se all'anemia iposideremica si associa il riscontro di ipocolesterolemia, la possibilità che il soggetto sia celiaco diventa quasi una certezza⁴.

Anche sugli screening di case-finding, l'anemia è il sintomo extra-intestinale che più aiuta a porre diagnosi di celiachia^{5,6}.



Figura 1. Albero genealogico di due cugine figlie di sorelle celiache. La diagnosi è stata posta a partire dal riscontro di anemia in una delle bambine.

Cave canem!

MARZIA LAZZERINI¹, FRANCESCA DE FRANCO²

¹Scuola di Specializzazione in Pediatria, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

²Struttura complessa di Pediatria, Ospedale di San Vito al Tagliamento, Pordenone

Silvia ha 3 anni, ha iniziato a presentare dolori addominali ricorrenti negli ultimi 3 mesi; è pallida, magra; presenta un addome prominente con un'evidente epatomegalia. All'anamnesi scopriamo che vive in campagna e presenta picacismo da 1 anno. Gli esami ematochimici rivelano un'anemia (Hb 8,8 g/dl) e una spiccata ipereosinofilia (15.000/mmc rappresentano il 58% di tutti i globuli bianchi), a fronte della normalità di transaminasi e gammaGT. Gli anticorpi specifici per la celiachia (sia EMA che anti-tTG) risultano positivi. Ma l'epatomegalia e l'ipereosinofilia ci preoccupano e decidiamo di approfondire. L'ecografia epatica rivela multiple formazioni nodulari ipoecogene, con fegato aumentato di dimensioni (*Figura 2 a*).

A questo punto le ipotesi diagnostiche si moltiplicano. Potrebbe trattarsi di una parassitosi? Ma non possiamo escludere una malignità. E se fosse un'istocitosi? Di certo una forma allergica non può spiegare tutto. La risposta la troviamo nel migliore amico della bimba: il suo cane. Gli anticorpi anti-*Toxocara canis* sono infatti positivi (sia nella bambina che nel cagnolino). L'in-

festazione da *Toxocara* si associa oltre che alla localizzazione epatica anche a localizzazione toracica e oculare. In particolare a livello polmonare la *Toxocara* determina un infiltrato nodulare diffuso, particolarmente accentuato nelle zone anteriori del torace (a mantellina), che si rende evidente anche alla radiografia e TAC del torace della bambina, pur essendo asintomatica. La visita oculistica risulta invece negativa.



Figura 2. Immagini ipoecogene diffuse legate all'infestazione da *Toxocara canis* (a) nel fegato di una bambina di 3 anni, che si presentava con anemia ipocromica, picacismo, celiachia, ipereosinofilia marcata. Scomparsa delle lesioni dopo terapia con albendazolo (b).

La celiachia nell'adulto vista dalla parte del pediatra

ALESSANDRO LENHARDT

Scuola di Specializzazione in Pediatria, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Tutto comincia quando Silvia, 8 mesi, viene ricoverata per il protrarsi da alcuni mesi della diarrea a fronte di un sempre più evidente ritardo di crescita, con flessione della curva che inizia dopo lo svezzamento.

La piccola risulta avere anticorpi EMA e anti-tTG positivi. A questo punto allarghiamo le indagini al resto della famiglia. Il fratello risulta negativo. Ma la mamma, che presenta una tiroidite autoimmune, alopecia e una storia di pregressi aborti, risulta a sua volta EMA e anti-tTG positiva e riceve la diagnosi di celiachia con la biopsia intestinale. La zia materna è anemica da sempre, senza mai trovare beneficio nell'assunzione di ferro per bocca. Anzi richiede multipli trattamenti trasfusionali con cui contrae l'HCV (Figura 3). Risulta a sua volta celiaca, così come la madre (nonna della piccola Silvia, con storia di stanchezza cronica e poliabortività) e una prozia.

Eleonora invece è una donna di 44 anni. A 12 anni l'alopecia universale la costringe a nascondersi sotto una parrucca che non le evita l'isolamento sociale. A 13 anni presenta una tiroidite di Hashimoto, per cui deve assumere terapia sostitutiva. Successivamente i denti le si sgretolano, non riesce nemmeno a tenere la protesi dentaria, per cui si isola ancora di più. Ma la sua sfortuna non è ancora finita perché, essendo anemi-

ca e non rispondendo alla supplementazione marziale per bocca, viene trasfusa e contrae così l'HCV. A 36 anni poi presenta delle fratture spontanee secondarie a un'osteopenia severa. Lamenta anche disturbi dispeptici, addebitati all'infezione da *Helicobacter pylori* ma il trattamento eradicante e antisecretivo non sortisce alcun beneficio. Solo successivamente sente parlare della celiachia e risulterà EMA e anti-tTG positiva. Non può non chiedersi: "Quanto diversa sarebbe stata la mia vita se lo avessi scoperto da bambina?"

Caroline ha 30 anni e già presenta una storia di poliabortività, che non le ha impedito di avere comunque un primo fi-

glio all'età di 27 anni. Ma è stato un parto difficile, il piccolo è nato prematuro (30 settimane di età gestazionale, con peso alla nascita di 800 grammi) ed ha avuto una sofferenza neonatale con paralisi cerebrale. Successivamente Caroline è risultata affetta da sindrome di Sjögren. E la vita già difficile si complica con il divorzio. Partecipa a una conferenza sulla celiachia, nel corso della quale aderisce allo screening sierologico. Viene testata e risulta positiva e a sua volta si chiede: "Quanto diversa poteva essere la mia vita!"

Questi casi non fanno altro che sottolineare come l'associazione tra celiachia e anemia sia estremamente frequente anche e soprattutto nell'adulto. Ma mettono in luce come siano spesso molte le occasioni perse dal pediatra per fare un'adeguata diagnosi di celiachia. Potrebbero infine risollevarsi l'annosa discussione sull'opportunità di fare uno screening, quantomeno di potenziare le iniziative di case-finding.

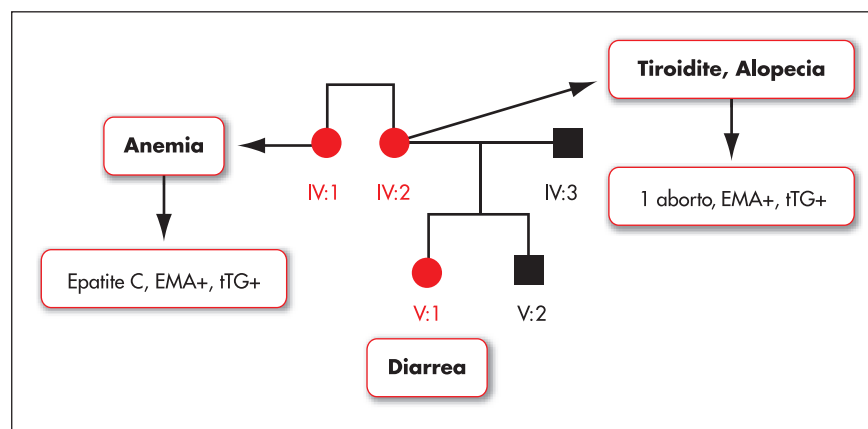


Figura 3. Un'altra famiglia di celiache, scoperte dopo la diagnosi di celiachia nella bimba di 8 mesi esordita con diarrea e arresto della crescita.

Quando la clinica vince la sierologia

IRENE BERTI

Scuola di Specializzazione in Pediatria, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Federica è una splendida bambina di 3 anni e mezzo. Improvvisamente il suo carattere cambia, diventa nervosa, è

pallida. Uno zio riceve la diagnosi di celiachia e anche Federica fa il test: negativo. Bene, ma lei non è più se stessa. Un

emocromo di controllo in effetti rivela una leggera anemia. Del resto mangia quasi solo latte, quindi il pediatra consiglia i genitori di variare la dieta e la arricchisce di ferro. Non va meglio. Esegue un carico di ferro che risulta piatto: non assorbe il ferro orale. Potrebbe avere un'anemia sideropenica (in origine carenziale) da mucosite secondaria alla deficienza stessa, oppure potrebbe essere colonizzata dall'*Helicobacter*. Sommini-

striamo del ferro per via parenterale e continuiamo il follow-up. Gli anticorpi EMA e anti-tTG sono sempre negativi, ha normalizzato ferritina ed emoglobina ma il test di assorbimento intestinale con i due zuccheri è ai limiti e il carico di ferro è ancora piatto. E se fosse celiaca pur senza anticorpi specifici?

In effetti presenta un HLA DQ2. La sottoponiamo alla biopsia duodenale che rivela lesioni di tipo Marsh 1 alternate a lesioni di tipo 3a, con linfociti gamma delta positivi. La mettiamo in dieta senza glutine e normalizza stabilmente l'emocromo. Siamo in attesa di ripetere il carico di ferro orale.

Il messaggio non può che essere quello di credere nella celiachia se la cli-

nica lo suggerisce. È ancora più importante della sierologia.

Bibliografia

1. Corazza GR, Valentini RA, Andreani ML, et al. Subclinical coeliac disease is a frequent cause of iron-deficiency anaemia. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:153-6.
2. Unsworth DJ, Lock RJ, Harvey RF. Improving the diagnosis of celiac disease in anaemic women. *Br J Haematol* 2000;111:898-901.
3. Howard MR, Turnbull AJ, Morley P, et al. A prospective study of the prevalence of undiagnosed celiac disease in laboratory defined iron and folate deficiency. *J Clin Pathol* 2002;55:754-7.
4. Ciacci C, Cirillo M, Giorgetti G, et al. Low plasma cholesterol: a correlate of nondiagno-

sed celiac disease in adults with hypochromic anemia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1888-91.

5. Sanders DS, Patel D, Stephenson TJ, et al. A primary care cross-sectional study of undiagnosed adult celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:407-13.

6. Hin H, Bird G, Fisher P, Mahy N, Jewell D. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* 1999;318:164-7.

7. Korman SH. Pica as a presenting symptom in childhood celiac disease. *Am J Clin Nutr* 1990;51:139-41.

8. Santos JA, Werlin SL. Celiac disease in childhood presenting with pica: case report. *Wis Med J* 1996;95:581-2.

9. Alvarez Martin T, Anso Oliván S, Prieto Contero I, et al. Pica as a form of presentation of celiac disease. *An Esp Pediatr* 1998;49:542-3.

10. Trujillo Rodriguez L, Leo Carnerero E. Pica and iron-deficiency anemia as presenting symptoms in celiac disease. *Med Clin (Barc)* 2002;11:759.

Ancora biopsia? Forse no!

Gli anticorpi anti-actina

STEFANO DE VIRGILIS

Dipartimento di Pediatria, Università di Cagliari

IS THE BIOPSY STILL NECESSARY? THE IMPORTANCE OF AUTOANTIBODIES AGAINST ACTIN FILAMENTS (Medico e Bambino 2005;24:437-439)

Key words

Autoantibodies directed against actin filaments (AAA), Apoptosis

Summary

Recently, serum of celiac patients affected by autoimmune hepatitis revealed autoantibodies directed against actin filaments (AAA). The preliminary results regarding AAA showed a strong correlation between AAA antibody titre and the severity of intestinal damage. The AAA testing showed high specificity given that AAA are not found in specific conditions such as Crohn's disease and autoimmune enteropathy. Further observations showed that the actin content of enterocytes increases if gluten is introduced in the culture. These data may suggest the possibility to avoid intestinal biopsy in case of AAA positivity, hence modifying the whole diagnostic protocol. At the same time, they may suggest that tissue transglutaminase lead to the development of gluten-dependent autoimmunity against actin with following tissue damage.

L'immagine dell'iceberg è sempre stata usatissima per esemplificare la variabilità clinica e istologica della malattia celiaca. La punta dell'iceberg rappresenta i casi sintomatici, mentre sotto il livello dell'acqua c'è la celiachia latente e silente senza sintomi evidenti ma con la presenza di alterazioni glutine-dipendenti anche solo minime dell'architettura mucosale e dell'immunità (Figura 1).

Nella popolazione di soggetti celiaci sono sempre presenti degli autoanticorpi che definiscono la condizione (anti-tTG) e un HLA predisponente. La presenza di un aplotipo predisponente naturalmente non basta, poiché si trova anche in una buona fetta della popolazione dei soggetti sani. Quanto al rapporto tra sierologia e danno istologico, vari studi hanno dimostrato che questo è solo parziale¹⁻⁴, da cui l'impossibi-

lità di sapere che cosa succede a livello intestinale senza avere a disposizione la biopsia.

Nel 2000 è stata però evidenziata una reazione immune specifica correlata alla gravità istologica della malattia celiaca, descrivendo un autoanticorpo diretto contro l'actina, una componente del citoscheletro, la cui quantità correla nettamente con la presenza di atrofia dei villi⁵ (Figura 2).

Le ricerche in merito agli anticorpi anti-actina (AAA) nella celiachia hanno avuto origine in modo molto casuale nel campo della ricerca in epatologia. In un gruppo di soggetti affetti da epatite autoimmune era stato isolato un autoanticorpo inizialmente scambiato per un anticorpo anti-muscolo liscio e poi scopertosi diverso. Questi soggetti si sono rivelati poi essere celiaci e si è scoperto attraverso la tecnica della microscopia elettronica a fluorescenza che l'autoanticorpo in questione riconosceva l'actina. Inizialmente gli studi sono stati fatti sulle cellule Hep (linea cellulare derivata da un carcinoma laringeo), poi la metodica è stata migliorata utilizzando cellule intestinali di ratto (IEC-6). Da questo iniziale dato è partito uno studio multicentrico in doppio cieco sull'analisi di sieri di controlli, di soggetti celiaci e di portatori di altre patologie intestinali, confrontando vari test sierologici e confrontandoli con gli aspetti istologici. Gli AAA hanno dimostrato una marcata positività nei gradi maggiori di atrofia dei villi intestinali, evidenziando una correlazione molto stretta tra il titolo anticorpale e la gravità del danno istologico, con una specificità del 95% (Figura 3). I sieri dei soggetti affetti da altre patologie infiammatorie intestinali, in particolare nel morbo di Crohn e in alcuni casi di enteropatia



Figura 1. L'iceberg della celiachia.

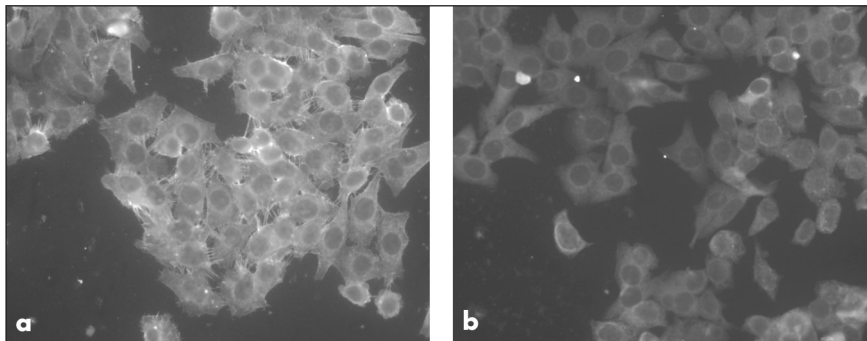


Figura 2. Anticorpi sierici anti-actina in un celiaco (a), paragonati con assenza di anticorpi anti-actina in un siero di un soggetto sano (b) su cellule Hep-6.

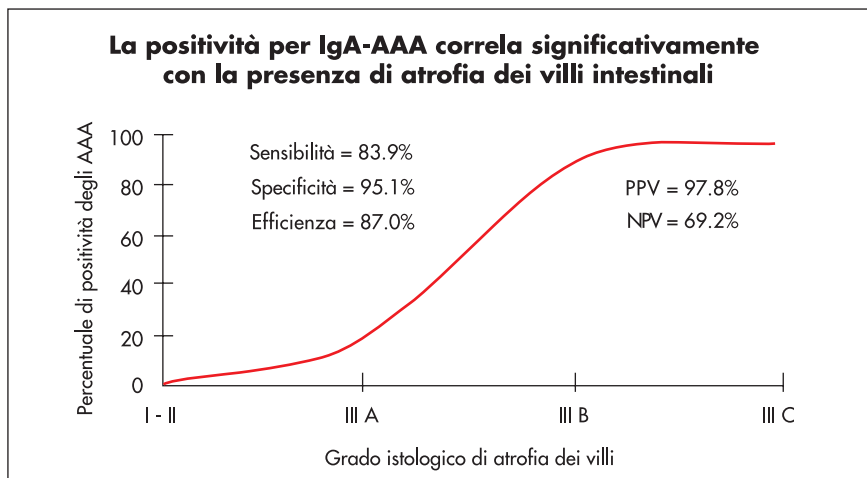


Figura 3. Correlazione tra il titolo degli anticorpi anti-actina e il grado istologico di danno della mucosa duodenale.

autoimmune, non contenevano gli AAA.

La comprensione dei fenomeni patogenetici che si nascondono dietro la reazione autoanticorpale contro il citoscheletro nella celiachia è molto importante. In particolare è determinante comprendere se precede le altre reazioni immuni. Potrebbero essere di aiuto alcune considerazioni in merito al ruolo del citoscheletro.

Il citoscheletro dell'enterocita è composto soprattutto da microtubuli e filamenti intermedi, composti da actina F (filamenti di actina, derivanti dalla polimerizzazione di monomeri di actina G) e componenti giunzionali. Durante il fenomeno della polimerizzazione l'actina è presente in tre stati: monomeri di actina G, polimeri in formazione, filamenti di actina F completi. La reazione autoanticorpale del celiaco è rivolta specificamente contro l'actina F. I rapporti di questi filamenti con le *tight junction* sono fortissimi, così come con altre componenti intracellulari e delle giunzioni transcellulari.

In effetti la struttura del citoscheletro è alla base delle sue numerose e importanti funzioni: interviene nella motilità e adesione cellulare, organizza i rapporti e i segnali che arrivano ai recettori cellulari, interviene quindi nei processi di endocitosi, regola la struttura della matrice intra ed extracellulare, interviene nell'apoptosi e in altri meccanismi che controllano il danno tissutale⁶⁹.

Ulteriori osservazioni sperimentali hanno dimostrato che, nell'enterocita, l'ingresso del glutine determina la polimerizzazione dell'actina stessa con conseguenze inevitabili anche se poco conosciute sull'organizzazione del citoscheletro e quindi sulla struttura dell'enterocita stesso¹⁰ (Figura 4).

Un'ipotesi affascinante potrebbe essere centrata su un'azione della transglutaminasi tissutale sui polimeri dell'actina, che verrebbero quindi presentati come antigeni non-self e innescare la risposta autoanticorpale che determinerebbe la destrutturazione e la disorganizzazione del citoscheletro con conseguente danno tissutale.

In conclusione, il riscontro degli anticorpi anti-actina è una delle novità più interessanti proposte dalla ricerca in questo campo degli ultimi anni. Nonostante sia evidente il bisogno di ulteriori acquisizioni per valutarne su larga scala sensibilità, specificità e potere predittivo con confronto sia con l'istologia che con la sierologia classica che con la genetica, la disponibi-

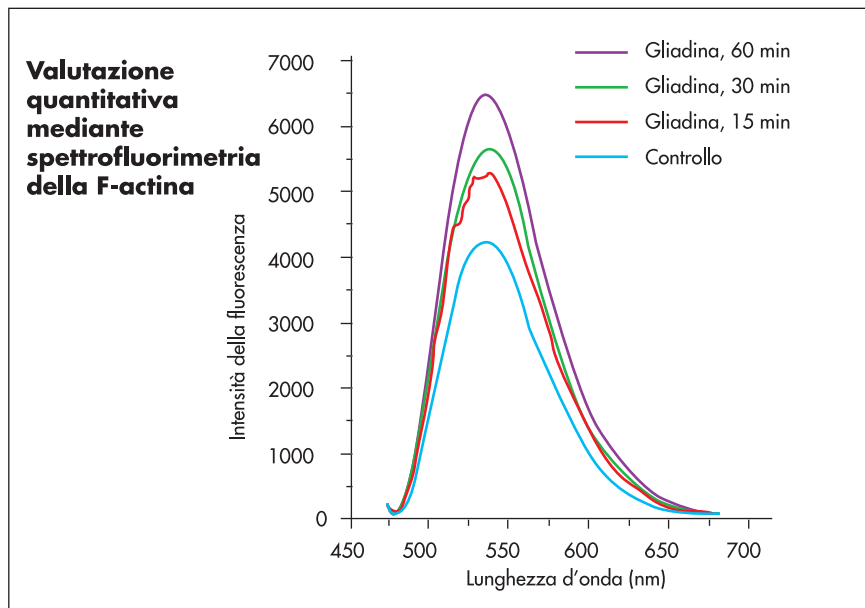


Figura 4. Effetti dell'introduzione in coltura cellulare della gliadina sul contenuto cellulare di filamenti di actina polimerizzata.

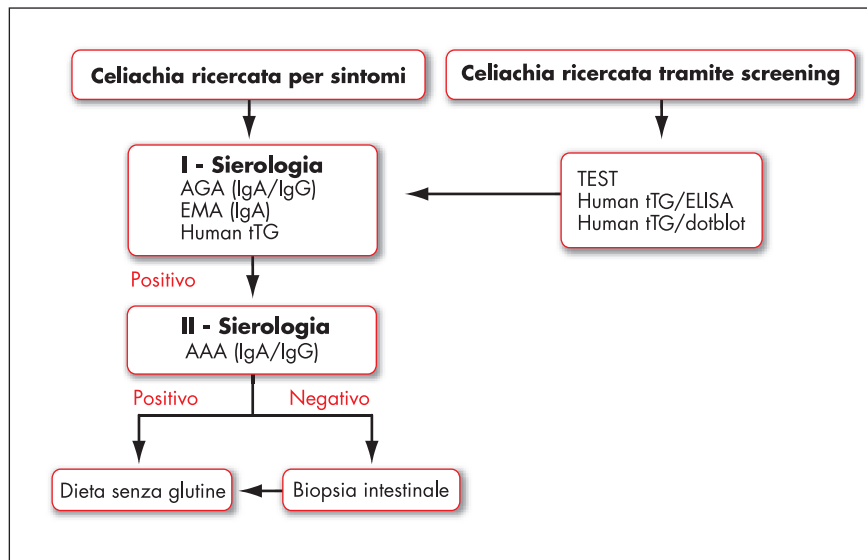


Figura 5. Possibile nuovo protocollo diagnostico per la celiachia dopo la validazione degli AAA come marker sierologico di danno istologico.

lità di questo interessante marcatore sierologico di danno istologico promuoverrebbe un nuovo protocollo diagnostico secondo il quale il primo passaggio rimane quello della sierologia classica, dopo di che i soggetti positivi vengono testati per gli AAA e se questi sono positivi si può formalizzare la diagnosi di celiachia senza biopsia; se gli AAA risultano negativi, bisogna approfondire effettuando lo studio dell'istologia duodenale per valutare in modo definitivo il sospetto di celiachia

fortemente suggerito dalla sierologia classica (Figura 5).

Bibliografia

1. Johnston SD, Watson RG, McMillian SA, Evans AE, Love AH. Serological markers for celiac disease: changes with time and relationship to enteropathy. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:259-64.
2. Bardella MT, Trovato C, Cesana BM, et al. Serological markers for coeliac disease: is it time to change? *Dig Liver Dis* 2001;33:426-31.

MESSAGGI CHIAVE

- È ormai noto che il rapporto tra la sierologia e il danno istologico nel celiaco può essere soltanto parziale.
- Gli anticorpi anti-actina correlano con la gravità del danno istologico con una specificità del 95% e in maniera netta con l'atrofia dei villi intestinali.
- La reazione autoanticorpale del celiaco è rivolta specificamente contro una specifica forma di actina, l'actina F, che è polimerizzata con le altre nella formazione dei filamenti intermedi del citoscheletro. Quando essa avviene, si altera la struttura del citoscheletro cellulare e quindi l'enterocita stesso.
- Un'ipotesi patogenetica sarebbe centrata sull'azione della transglutaminasi umana tissutale sui polimeri di actina, che verrebbero presentati come antigeni non-self, innescando una risposta anticorpale in grado di distrutturare il citoscheletro cellulare e di creare quindi il danno tissutale.
- La disponibilità di questo nuovo marcatore potrebbe suggerire un nuovo protocollo diagnostico, per cui i soggetti positivi alla sierologia classica (EMA, tTG) e agli anti-actina non necessiterebbero della biopsia duodenale.

3. Ciacci C, Cavallaro R, Della Valle N, et al. The use of serum tTG-Ab assay in patients on gluten-free diet as measure of dietetic compliance. *Gastroenterology* 2002;122:588.
4. Sbarbati A, Valletta E, Bertini M, et al. Gluten sensitivity and "normal" histology: is the intestinal mucosa really normal? *Dig Liver Dis* 2003;35:768-73.
5. Clemente MG, Musu MP, Frau F, et al. Immune reaction against the cytoskeleton in celiac disease. *Gut* 2000;47:520-6.
6. Varedi M, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE. Cytoskeleton regulates expression of genes for transforming growth factor-beta and extracellular matrix proteins in dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* 1997;172:192-9.
7. Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredeisen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *PNAS* 1996;93:2234-8.
8. Tomasek JJ, Hallyday NL, Updike DL, et al. Gelatinase A activation is regulated by the organization of the polymerized actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1997;272:7482-7.
9. Chintala SK, Sawaya R, Aggarwal BB, et al. Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells. *J Biol Chem* 1998;272:1354-51.
10. Clemente MG, De Virgili S, Fasano A, et al. Gliadin induces a time dependent increase in the cellular content of polymerised actin filaments. *Gut* 2003;52:218-23.

Ancora biopsia? Forse sì!

STEFANO MARTELOSSI

Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

IS THE BIOPSY NECESSARY? ARGUMENTS IN SUPPORT

(Medico e Bambino 2005;24:440-442)

Key words

Intestinal biopsy, ESPGHAN criteria

Summary

Usually the diagnosis of celiac disease is an easy task, thanks to the availability of good serology tests and to the intestinal biopsy, which represents a precious chance of looking at the gluten toxicity right in the gut. Although the significant improvement in the research field, biopsy is still required by the international protocol, in particular according to the ESPGHAN criteria. Intestinal biopsy offers the advantage of avoiding the gluten challenge and of promoting a better diet compliance, by giving a certain diagnosis. Moreover the biopsy can be useful in denying those cases in which a wrong diagnosis of celiac disease was put.

La diagnosi di celiachia è una diagnosi facile. Abbiamo a disposizione dei test sierologici con buona sensibilità e specificità, e l'esecuzione della biopsia intestinale ci permette di vedere direttamente il danno specifico, con la classificazione di Marsh che guida e in qualche modo rende il più possibile univoca l'interpretazione.

Eppure tra tutti i mezzi diagnostici a disposizione, la biopsia intestinale rimane quello il cui esito ha maggior probabilità di metterci in difficoltà. Che dire di fronte a soggetti con clinica suggestiva, anticorpi specifici positivi e un referto istologico biopsico normale? Oppure di fronte a un soggetto con anticorpi specifici negativi ma col referto istologico di una biopsia (fatta per altre ragioni) che descrive un'atrofia dei villi duodenali?

Il problema centrale infatti è che i servizi di gastroenterologia solo raramente sono "dedicati" alla diagnosi di celiachia e quindi pagano un grado variabile di inesperienza con conseguenti inesattezze procedurali e di interpretazione.

Eppure la biopsia intestinale deve essere eseguita. Perché?

BIOPSIA SÌ PER PROTOCOLLO

La biopsia duodenale, storicamente, era l'unico modo per porre diagnosi di

malattia celiaca, ancor prima della scoperta dei marcatori sierologici. Si dovevano eseguire infatti ben 3 biopsie all'esordio, in dieta e dopo scatenamento per dimostrare la glutine-dipendenza del danno.

Ancora oggi la biopsia rientra nei criteri fondamentali (ESPGHAN 1990) per la diagnosi di celiachia e per mettere un soggetto a dieta senza glutine per tutta la vita, senza necessità di scatenamento (Box 1):

- storia clinica compatibile con la malattia celiaca

- screening sierologico compatibile
- danno istologico compatibile
- risposta clinica e sierologia alla dieta senza glutine
- soggetti di età superiore ai 18 mesi
- escluse altre condizioni cliniche che possano mimare la celiachia

BIOPSIA SÌ PER DEFINIRE LA DIAGNOSI

È a livello intestinale che si realizzano i meccanismi che attivano la risposta immunologica che sottende la malattia, forse prima ancora di ritrovarne i marcatori nel siero.

I test sierologici sono buoni, perdono davvero pochi pazienti ma esistono le situazioni in cui gli anti-tTG risultano positivi e gli EMA sono negativi; esistono persino le rarità ovvero sieri EMA positivi e anti-tTG negativi, pazienti con clinica suggestiva ma sia EMA che anti-tTG negativi; esiste il deficit di IgA in celiachia che non viene risolto del tutto da IgG EMA e IgG anti-tTG. Certo abbiamo a disposizione la genetica che aiuta ulteriormente a selezionare i pazienti.

La biopsia deve risolvere le situazioni in cui il sospetto clinico è forte (Box 2 e 3).

BIOPSIA SÌ PER NEGARE LA DIAGNOSI...

Molto spesso in medicina è più difficile negare la diagnosi piuttosto che farne una. A volte la biopsia intestinale è necessaria per negare la diagnosi di celiachia a soggetti in cui il sospetto non ave-

Box 1

Gabriele è un bambino di 10 mesi, il fratello è celiaco. La sua curva di crescita ponderale mostra un'evidente flessione dopo lo svezzamento quando è comparsa anche la diarrea. Gli esami rivelano ipoprotidemia e deficit coagulativo. È una crisi celiaca chiara ma gli anticorpi EMA e anti-tTG risultano negativi, solo gli AGA sono positivi. La tipizzazione genetica dimostra la presenza di una HLA DQ2. Viene eseguita una biopsia intestinale dopo aver corretto il deficit coagulativo e riceviamo un referto che descrive una mucosa di tipo Marsh 3c.

Era indispensabile effettuare la biopsia?

Sì: aveva meno di 2 anni e avrebbe dovuto sottoporsi a un challenge; gli anticorpi specifici erano negativi. Certo è che questo bambino presentava un quadro clinico che parlava da sé, ed è stato facile decidere di procedere nonostante l'inusuale negatività dei test sierologici.

Il caso ci insegna che, quando manca un pezzo del puzzle, è ancora più importante effettuare la biopsia. Non ci si può accontentare del risultato della sierologia, che può sbagliare in un senso e nell'altro: la diagnosi deve passare su un approfondito ragionamento clinico.

Box 2

Matteo è un bambino di 5 anni, che ha ricevuto la diagnosi di morbo di Crohn per una storia caratterizzata da ragadi anali e arresto della crescita e per alcuni aspetti laboratoristici (test ai due zuccheri alterato, riscontro biotipico di colite granulomatoso). La compresenza di cheilite angolare e afiosi recidivante ci fa sospettare il morbo di Behçet, che però escludiamo. La malattia di Matteo si dimostra ben presto corticoidipendente e resistente, ma risponde bene alla terapia con talidomide a basse dosi. Sia EMA che anti-tTG vengono valutati una prima volta nel 2000 e risultano negativi.

Nel 2001 partecipa come controllo alla ricerca sugli anti-tTG salivari e risulta positivo. Successivamente, nel 2002, positivizza anche EMA e anti-tTG sierici. La biopsia della mucosa duodenale e di quella orale mostrano un'infiltrazione linfocitaria in entrambi i distretti, insieme alla presenza di atrofia intestinale.

Era indispensabile effettuare la biopsia?

Si: di fronte a una clinica ambivalente e alla compresenza di un'altra patologia era necessario valutare quello che avveniva a livello duodenale. Gli anticorpi salivari sono al momento sperimentali, ma nel suo caso sono stati testimoni della maturazione della risposta immunologica al glutine.

Box 3

Sara è una donna di 42 anni, che presenta una lunghissima storia di anemia che non risponde alla supplementazione con ferro per bocca. Ha eseguito un primo dosaggio degli EMA nel 1998 che erano risultati negativi. Nel 2001 è sempre anemica; si sottopone a un nuovo screening sierologico che rivela la presenza di anti-tTG positivi. Sara presenta un HLA DQ8 e la biopsia intestinale mostra atrofia intestinale con grado 3b di Marsh.

Era indispensabile effettuare la biopsia?

Si: e sarebbe stato meglio farla prima, alla luce della "sola" clinica, fortemente suggestiva. Senza lo sviluppo (allora imprevedibile) della tecnica degli anti-tTG avremmo perso la diagnosi.

va forti basi cliniche ed è stato sostenuto da test non ortodossi. Nonostante il risultato negativo della sierologia specifica e l'assenza di una predisposizione genetica, continuerebbero a fare dieta. La biopsia permette di chiudere il problema una volta per tutte.

... E PER UNA DIAGNOSI CERTA

La biopsia intestinale serve per formalizzare una diagnosi certa di celiachia per tutta la vita, per una diagnosi inattaccabile che dia una motivazione forte e una compliance dietetica migliore e che protegga il soggetto dai propri dubbi ma anche dagli altri gastroenterologi. Infatti qualsiasi gastroenterologo avrebbe il diritto di proporre uno scatenamento a un soggetto diagnosticato senza biopsia!

E non dimentichiamo che anche in pediatria la biopsia intestinale è ormai di-

ventata una procedura semplice, grazie ai nuovi strumenti e soprattutto grazie alla sedazione.

Esistono molte altre motivazioni che possono spingere un medico a fare eseguire una biopsia intestinale.

Spesso la biopsia viene fatta in risposta a delle esigenze forti del paziente stesso, quasi di rinforzo a una diagnosi ricevuta in modo non convincente o consapevole in passato che lo ha "convinto" a riassumere il glutine. Esistono molti soggetti che credono di essere "guariti" dalla celiachia e hanno liberalizzato la dieta. Alcuni sono sintomatici e magari è più facile agganciarli ma anche motivarli. Altri sono asintomatici apparentemente, inconsapevoli dell'esistenza di segni spesso subdoli ma non meno gravi. E poi esistono gli adolescenti, che magari hanno ricevuto la diagnosi da piccoli e che entrano in crisi perché hanno bisogno di ribellarsi alla celiachia oltre che al resto

del mondo. Per queste persone, la biopsia intestinale nel challenge può quindi essere quanto meno utile, nonostante sia un'indicazione non perfettamente corretta (dovrebbero bastare i test sierologici, soprattutto se associati alla tipizzazione dell'HLA).

D'altro canto la biopsia serve per esplorare completamente l'iceberg. In particolare il gastroenterologo endoscopista non dovrebbe perdere l'occasione di eseguire una biopsia duodenale se, "per caso", si trovasse davanti i seguenti segni endoscopici di sospetto:

- l'assenza delle pliche e l'edema della mucosa
- lo scalloping ovvero la pettinatura delle pliche
- la micronodularità del duodeno
- l'acciottolato del duodeno

Uno studio italiano¹ dimostra un impressionante aumento delle diagnosi di celiachia con la semplice introduzione della biopsia duodenale a ogni esame gastroscopico: l'incidenza di celiachia nel periodo tra il 1992 e il 1997 era di 1 ogni 724 esami endoscopici; nel periodo successivo 1998-2001 con l'introduzione della biopsia a ogni procedura l'incidenza era di 1:118. Infatti molto spesso l'endoscopista non conosce bene il paziente ed esegue l'esame su prescrizione di altri. Peraltro, in questo studio in particolare, ben 13 degli 88 soggetti diagnosticati nell'ultimo periodo dello studio erano asintomatici. In 70 degli 88 soggetti (79.5%) erano presenti segni endoscopici macroscopici indicativi di celiachia. La diagnosi di celiachia è quindi una delle motivazioni principali ad eseguire da protocollo delle biopsie in corso di ogni endoscopia, con evidenti vantaggi anche sul piano dei costi/benefici.

La biopsia DEVE essere fatta nei soggetti selezionati con programmi di screening di popolazione. Si tratta infatti spesso di soggetti asintomatici, di situazioni limite in cui abbiamo ancora tanto da imparare e conoscere. La biopsia intestinale deve ancora essere fatta per riempire, con un minimo di rigore scientifico, i buchi di quel grande puzzle che è la celiachia. Rappresenta infatti tuttora il gold standard a cui si può e si deve fare riferimento per tutte le novità che emergono in questo campo. Anche gli anticorpi anti-actina, recentemente descritti come marker sierologico del danno tissutale, devono ancora essere validati².

MESSAGGI CHIAVE

- La biopsia intestinale eseguita in centri "dedicati" alla diagnosi di celiachia riduce al minimo gli errori conseguenti a inesattezze procedurali e d'interpretazione.
- La biopsia intestinale rientra tutt'oggi nei criteri ESPGHAN per la diagnosi di celiachia.
- La biopsia intestinale serve al clinico per la conferma diagnostica, per negare una diagnosi di malattia, per rendere una diagnosi inattaccabile e motivare il paziente, specie se asintomatico, a eseguire la dieta nel modo migliore e con la miglior compliance.
- La biopsia va eseguita in tutti i soggetti identificati tramite i programmi di screening di popolazione che più spesso di altri sono asintomatici.
- La biopsia intestinale rappresenta ancora il gold standard a cui si deve far riferimento per la validazione di tutte le nuove metodiche di supporto diagnostiche, in particolare di tipo sierologico.

Per chiarezza va detto che la biopsia intestinale non è indispensabile per la certificazione di celiachia (permanente e non soggetta a rinnovo) e l'ottenimento dell'esenzione in qualità di malattia rara. La legge del 2001 (che abroga quella del 1982) non nomina la biopsia ma precisa che sono solo i centri di riferimento regionali che possono fare la certificazione.

Non vi è invece evidenza circa l'opportunità di eseguire la biopsia intestinale nel follow-up, per controllare l'adesione alla dieta. Infatti, sebbene la letteratura metta in dubbio l'attendibilità dei test sierologici per controllare l'effettiva esclusione del glutine e quindi la riparazione del danno intestinale³, a fronte della remissione della sintomatologia non vi sarebbe alcun vantaggio dell'eseguire la biopsia di controllo. Bisognerebbe poi discutere del momento in cui eventualmente eseguire la biopsia rispetto al supposto inizio della dieta.

Un ultimo aspetto da sfatare è l'idea che imporre la biopsia intestinale possa scoraggiare i pazienti e fare loro interrompere l'iter diagnostico. L'esperienza di alcuni screening di popolazione negherebbe l'importanza di questo aspetto. In uno screening di 3188 scolari delle elementari sono stati identificati 33 sog-

getti positivi agli anti-tTG, a cui è stata appunto proposta la biopsia intestinale⁴. Solo 3 su 33 hanno rifiutato di sottoporsi alla procedura; di questi 1 ha interrotto le indagini perché i genitori avevano già deciso di non accettare la diagnosi e la conseguente dieta.

LA NOSTRA CASISTICA

Nell'ambito di 302 diagnosi di celiachia effettuate in 3 anni, è stata posta diagnosi senza effettuare la biopsia intestinale solo in 10 casi, tutti con EMA positivi. Le ragioni che hanno portato a formalizzare la diagnosi senza il referto istologico sono state essenzialmente il rifiuto del paziente (in 4 soggetti, comunque con quadro clinico molto chiaro), i rischi correlati alla sedazione considerata irrinunciabile nei bambini (in altri 4 soggetti); infine la presenza di una crisi celiaca severa e la necessità di avviare la dieta senza glutine dilazionando la biopsia, successivamente non più eseguita (in 2 casi).

In 20 soggetti la biopsia (corredata

anche da una genetica predisponente) ha permesso di porre la diagnosi di celiachia con anti-tTG positivi a fronte di EMA negativi

Bibliografia

1. Vjero K, Martucci S, Alvisi C, et al. Defining a proper setting for endoscopy for celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15(6):675-8.
2. Clemente MG, Musu MP, Frau F, et al. Immune reaction against the cytoskeleton in celiac disease. *Gut* 2000;47:520-6.
3. Lee SK, Lo W, Memeo L, et al. Duodenal histology in patient with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Gastrointest Endosc* 2003;57(2):187-91.
4. Tommasini A, Not T, Kiren V, et al. Mass screening for celiac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch Dis Child* 2004;89:512-5.

M_{EB}

Quale biopsia?

VITTORIO VILLANACCI

Dipartimento di Il Patologia Chirurgica, Spedali Civili, Brescia

THE POINT ON THE INTESTINAL BIOPSY

(Medico e Bambino 2005;24:442-446)

Key words

Duodenal biopsy, Intraepithelial lymphocytes

Summary

When diagnosing celiac disease, the intestinal biopsy represents a moment of close collaboration between the pathologist and the clinician. The accuracy of the histological diagnosis depends on the number and the adequate placement of the biopsies on the slides. It is fundamental to correctly interpret the biopsy in order to recognise artefacts and to describe the different mucosal strata, the relation between villus/crypt and the presence of intraepithelial lymphocytes. All these characteristics are of great help for the clinician in order to identify non clear celiac forms.

Non si può negare l'esistenza di numerose e valide motivazioni a sostegno della tesi che la biopsia intestinale è superflua nella formalizzazione della diagnosi di celiachia. In effetti una clinica

suggestiva, EMA, anti-tTG, anti-actina, HLA forniscono in molti casi una diagnosi inequivocabile. Anzi paradossalmente, può succedere che la risposta del patologo confonda le carte, manchi la diagnosi,

o risultati insufficientemente determinata.

Il problema centrale è quello della corretta interpretazione patologica della biopsia stessa; a sua volta, questa dipende dalla disponibilità di un numero adeguato di campioni biotipici, dalla qualità dei preparati e specialmente dal corretto orientamento del pezzo¹.

L'ORIENTAMENTO E IL NUMERO ADEGUATO DI BIOPSIE

Per orientamento di una biopsia si intende il posizionamento del frammento di tessuto tale da evidenziare correttamente tutti gli strati della parete.

Già nel 1993 si è dimostrata l'utilità di un metodo che sfruttava il posizionamento delle biopsie intestinali di ciascun paziente su un filtro millipore di acetato di cellulosa, fatto direttamente dal gastroenterologo endoscopista, in sequenza secondo la sede di prelievo. Le biopsie non vengono più manipolate, ma il filtro viene incluso in modo standard nel blocchetto di paraffina che a sua volta viene ruotato e sezionato secondo un criterio preciso (Figura 1). Questo metodo si può e deve applicare a tutto l'apparato gastro-enterico dove è essenziale lo studio dei rapporti dei vari strati della parete tra di loro, l'osservazione e la descrizione del disordine architetturale. La pre-

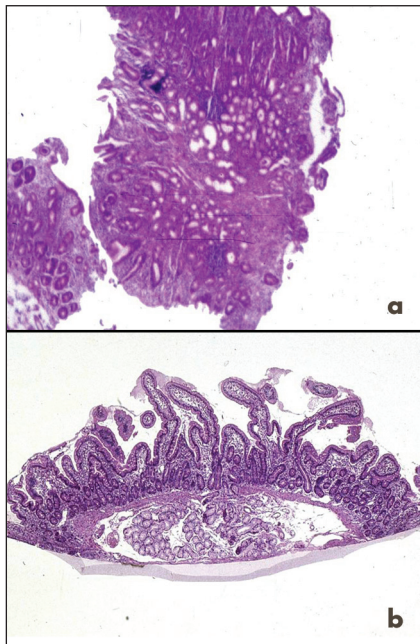


Figura 1. Esempi di biopsia duodenale orientata (a) e non (b).

senza del filtro millipore non inficia l'applicazione di colorazioni specifiche e delle varie tecniche di immunohistochimica (ad esempio la marcatura con anti-CD3) (Figura 2). La diffusione di questo metodo consente anche un risparmio economico, poiché permette di studiare le sezioni di 8 frammenti biotipici sullo stesso vetrino².

L'INTERPRETAZIONE PATOLOGICA DELLA BIOPSIA

Il corretto orientamento del pezzo aiuta a ridurre gli artefatti, che comunque esistono ed è compito di un bravo patologo sapere riconoscere. Alcuni esempi di artefatti che possono condurre a un'errata diagnosi di atrofia o subatrofia intestinale sono: i villi a fisarmonica, la fusione di villi contigui, il bigeminismo dei villi, la presenza di nuclei addossati gli uni agli altri per l'effetto della sezione che dà la falsa idea di aumento dei linfociti intraepiteliali (IEL) (Figura 3).

Quindi ancora più importante del riconoscimento degli artefatti è il riconoscimento di una mucosa veramente normale. Quando la biopsia è perfettamente orientata, è possibile dire che c'è una mucosa normale, individuando con facilità il rapporto villo/crypta di 3:1 (Figura 4). Questo dato deve essere specificato nel referto istopatologico. L'altro parametro che non può e non deve essere omissivo è relativo al numero di IEL, facilmente visualizzabili con la colorazione anti-CD3. Esiste una vasta discussione in letteratura in merito al numero normale di IEL, che varia tra il 25% rispetto alle cellule epiteliali³ e il 40%⁴.

Inizialmente Marsh aveva individuato 3 tipi fondamentali di lesione: il tipo 1 ovvero infiltrativi, solo con aumento degli IEL; il tipo 2 ovvero iperplastica, con infiltrato intraepiteliale e iperplasia delle cripte ghiandolari; il tipo 3 ovvero distruttiva, con distruzione e appiattimento dei villi, infiltrazione, evidenza di mitosi anche a livello dell'apice dei villi⁵ (Figura 5). Successivamente tale classificazione è stata ampliata e modificata da Oberhuber, che ha suddiviso la lesione più grave in 3 sottotipi, denominati Marsh 3a, Marsh 3b e Marsh 3c in relazione alla gravità dell'atrofia dei villi⁶ (Tabella I).

Chiaramente le lesioni caratterizzate da atrofia totale sono facili da interpretare, e sottendono situazioni cliniche in cui



Figura 2. Applicazione del sistema di orientamento con l'ausilio di filtro millipore di acetato di cellulosa (a), con successiva colorazione con anti-CD3 (b).

spesso la biopsia non aggiunge nulla di nuovo. Il problema sorge evidentemente di fronte alle lesioni di tipo 1, dove è fondamentale la valutazione del numero dei linfociti intraepiteliali e quindi l'utilizzo della colorazione anti-CD3 è centrale (Figura 6).

Questo rappresenta in effetti il problema fondamentale dell'interpretazione patologica delle biopsie duodenali, considerando che molti patologi europei non contano gli IEL o, se lo fanno, non comunicano il dato al clinico⁷. Eppure si tratta proprio dell'aspetto più tipico, iniziale e sensibile, della specifica azione del glutine sulla mucosa⁸.

Nella lesione iniziale nel tipo Marsh 1 e 2, la sensibilità degli EMA risulta essere molto bassa⁹, anche se resta da discutere il significato del riscontro di lesioni di tipo 1 di Marsh e quindi con architettura mucosale normale in assenza degli anticorpi specifici per la celiachia¹⁰. In questi casi diventano centrali la correlazione con la clinica e la tipizzazione genetica.

L'aumento di IEL senza altri segni istopatologici può essere specifico, ma non abbiamo conoscenze sufficienti per chiudere il problema, e pazienti di questo tipo dovrebbero essere seguiti nel tempo¹⁰. Infatti, l'aumento degli IEL potrebbe rappresentare il primo segno di una celiachia altrimenti non ancora espressa. In questi casi potrebbe essere determinante applicare lo screening dei linfociti che esprimono il recettore gamma/delta¹¹.

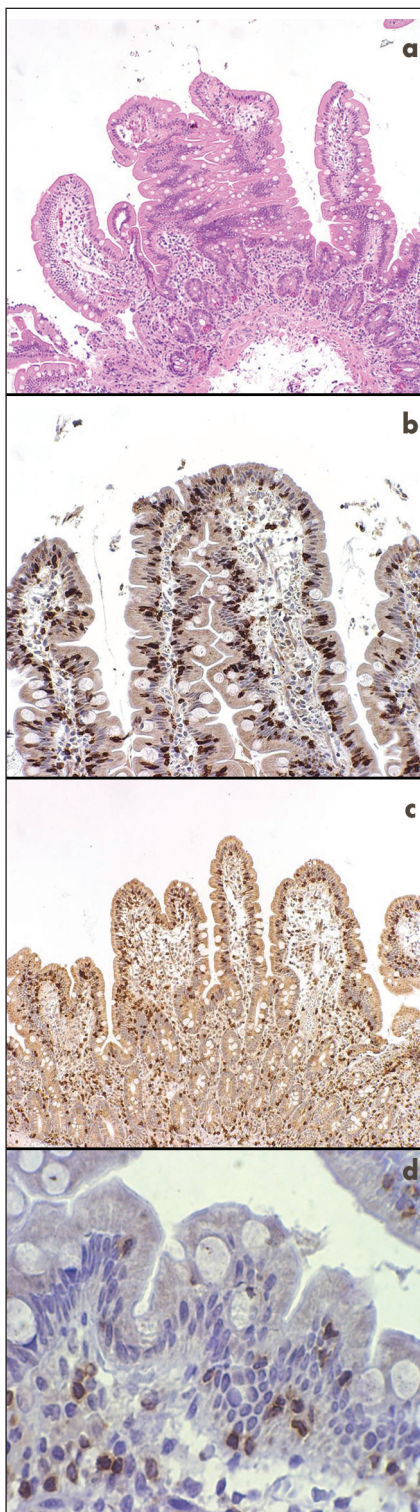


Figura 3. Artefatti della mucosa duodenale: a) villi a fisarmonica; b) fusione di villi; c) bigeminismo; d) nuclei di cellule epiteliali addossati che sembrano indicare un aumento di linfociti intraepiteliali, negato con la colorazione anti-CD3.

Una piccola esperienza personale ci ha permesso di rivalutare 122 casi di biopsie duodenali con note patologiche, in particolare 98 con lesione di tipo Marsh 1 e 24 di tipo Marsh 2. Tutti i soggetti presentavano una clinica significativa, che poteva fare sospettare la malattia celiaca (il 70% presentavano anemia, il 20% dolori addominali, il 10% diabete e altro). Un aplotipo HLA predisponente era presente solo nel 57.3% dei casi (Figura 7). In 13 soggetti gli anticorpi EMA e anti-tTG, negativi al momento della biopsia, si erano successivamente (in un periodo massimo di 2 anni) positivizzati.

Il ruolo del patologo è quindi quello di descrivere in modo completo quello che vede e non di esprimere una diagnosi clinica (Tabella II), fermo restando che il danno istologico esiste in funzione dell'esposizione quantitativa e temporale alla gliadina. Quindi sarà il clinico, in possesso dei dati completi (la clinica, la sierologia, non ultimo appunto il timing della biopsia rispetto alla dieta senza glutine), a stabilire infine la diagnosi.

L'ANATOMO-PATOLOGO E LE COMPLICANZE DELLA CELIACHIA

Un aspetto particolare è quello della celiachia refrattaria, situazione definita dall'assenza di guarigione istologica dopo dieta senza glutine. L'anatomo-patologo ha portato un contributo di ricerca importante dimostrando che il tipo di lesione che sottende una celiachia refrattaria

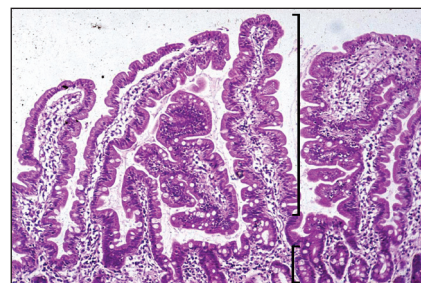


Figura 4. Rapporto villi/cripte di 3:1 in mucosa duodenale normale.

alla dieta senza glutine potrebbe essere diverso rispetto alla lesione che caratterizza la malattia celiaca alla diagnosi. Alcuni Autori francesi infatti hanno applicato marcatori anti-CD3 e anti-CD8 e studiato l'espressione del recettore gamma/delta nei casi di sospetta celiachia refrattaria, individuando un infiltrato CD3+CD8- con riarrangiamenti del gene per il recettore gamma/delta¹².

Un'altra situazione correlata alla celiachia e che merita di essere descritta dall'istologo è la cosiddetta sprue collagenosica, complicanza descritta dall'ispessimento della banda connettivale sottomucosale diagnosticabile solo istologicamente (Figura 8).

La complicanza più temuta, seppur rara, è quella della presenza di un linfoma intestinale. In questa situazione l'anatomo-patologo non solo è determinante per la diagnosi differenziale ma fornisce la tipizzazione delle cellule, molto importante per la prognosi.

Problemi di diagnosi differenziale ma

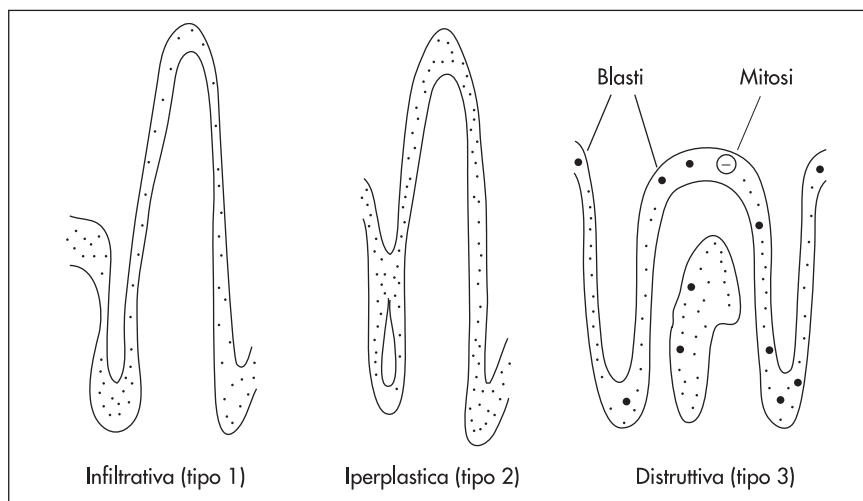


Figura 5. La classificazione di Marsh della mucosa duodenale nell'enteropatia glutine-dipendente (da voce bibliografica 6, modificata).

Focus

LA CLASSIFICAZIONE DI MARSH MODIFICATA DA OBERHUBER⁷

	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3a	Tipo 3b	Tipo 3c
IEL*	< 40	> 40	> 40	> 40	> 40	> 40
CRIPTE	Normale	Normale	Ipertrofiche	Ipertrofiche	Ipertrofiche	Ipertrofiche
VILLI	Normali	Normali	Normali	Artofia lieve	Atrofia marcata	Assenti

*I valori sono dati come linfociti intraepiteliali/cento cellule epiteliali

Tabella I

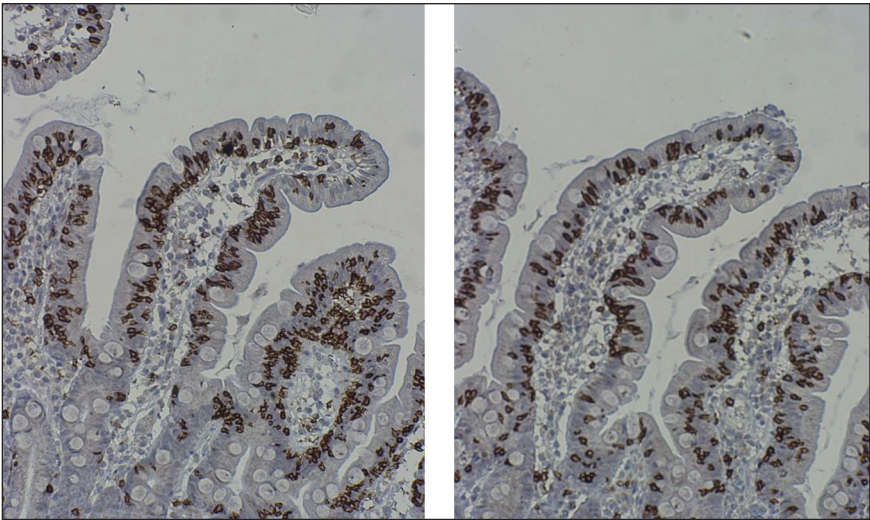


Figura 6. Intenso infiltrato intraepiteliale evidenziato con colorazione anti-CD3.

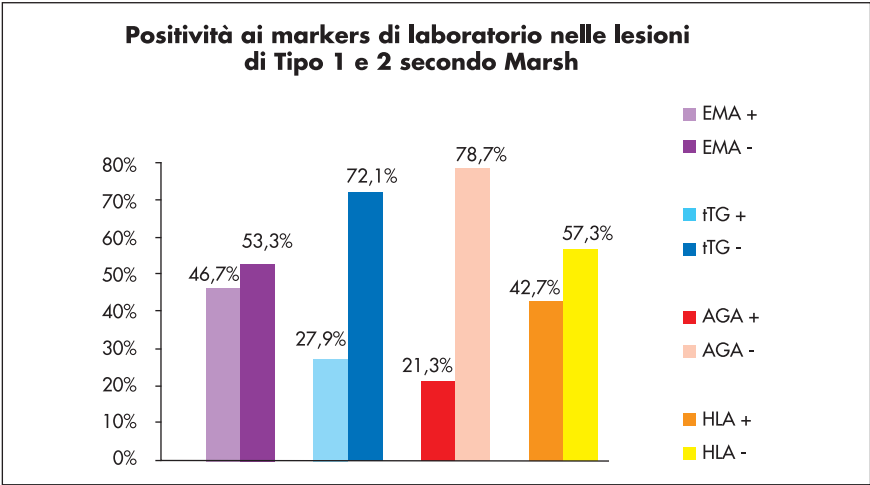


Figura 7. Un'esperienza di rivalutazione di una casistica dalla lesione istologica alla sierologia.

spesso anche di associazione morbosa possono derivare da alcune infezioni. In particolare è relativamente comune osservare casi di giardiasi, infezione da *Cryptosporidium* o *Microsporidium*.

È importante inoltre distinguere la

celiachia dalle manifestazioni allergiche intestinali, sempre caratterizzate da infiltrato eosinofilo (di solito si considerano patologici in modo specifico più di 60 eosinofili per dieci campi ad alto ingrandimento).

PARAMETRI VALUTATI NEL REFERTO ANATOMO-PATOLOGICO

- Numero delle biopsie
- Orientamento
- Villi: normali, atrofia lieve-moderata-severa
- Rapporto villo/cripta
- Linfociti intraepiteliali
- Colorazione con anti-CD3
- Strutture ghiandolari (cripte)
- Lamina propria

Tabella II

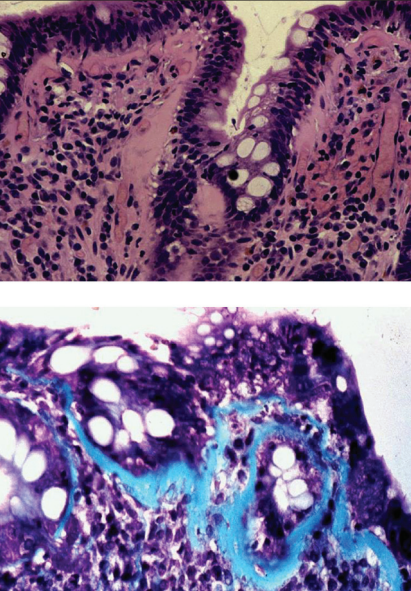


Figura 8. Sprue collagenosa. È ben evidente la banda connettivale sottomucosale.

In conclusione, è importante che ognuno svolga bene il proprio compito. Se il clinico è sicuro della diagnosi, forse davvero la biopsia è superflua. Ma di certo se la biopsia si fa, deve essere fatta e letta bene e di questo l'unico responsabile deve essere l'anatomo-patologo. I centri di riferimento per la diagnosi della malattia celiaca dovrebbero garantirsi un servizio di anatomo-patologia adeguato, con cui avere un rapporto di chiarezza e fiducia. Va inoltre sottolineato che, una volta effettuata la biopsia, questa resta uno strumento diagnostico anche per l'avvenire, perché i frammenti rimangono a disposizione per interpretazioni e rivalutazioni successive.

MESSAGGI CHIAVE

- L'accuratezza della diagnosi istopatologica di celiachia dipende dal numero e dall'adeguato orientamento delle biopsie duodenali.
- Il corretto orientamento riduce il rischio di artefatti, permette un'attenta visualizzazione dei vari strati della mucosa, facilita l'analisi del rapporto villo/cripta.
- L'utilizzo dell'analisi immunostochimica (mediante colorazione anti-CD3) permette di identificare il numero dei linfociti intraepiteliali (IEL) e di fornire un ulteriore parametro diagnostico nelle forme meno espresse di danno glutine-dipendente.

Bibliografia

1. Green PH, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003;362:383-91.
2. Auriati L, Truini M, Sebastiani P, Bruzzone G, Fiocca R. Use of cellulose millipore filters for the correct orientation of endoscopic biopsies in digestive diseases. *Pathologica* 2003;95:146-51.
3. Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O'Mahony S. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol* 2002;55:393-4.
4. Ferguson A, Ziegler K. Intraepithelial lymphocyte mitosis in a jejunal biopsy correlates with intraepithelial lymphocytes count, irrespective of diagnosis. *Gut* 1986;27:675-9.
5. Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut* 1990;31:111-4.
6. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94.
7. Rostami K. From microenteropathy to villous atrophy: what is treatable? *Dig Liver Dis* 2003;35:758-73.
8. Antonioli DA. Celiac disease: a progress report. *Mod Pathol* 2003;16:342-6.
9. Rostami K, Kerckhaert J, Tiemessen R, et al. Sensitivity of antiendomysium and anti gliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. *Am J Gastroenterol* 1999;94:888-94.
10. Kakar S, Nehera V, Murray JA, Dayharsh GA, Burgart LJ. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2027-33.
11. Jarvinen TT, Kaukinen K, Laurila K, et al. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1332-7.
12. Patey-Mariaud de Serre N, Cellier C, Jabri B, et al. Distinction between coeliac disease and refractory sprue: a simple immunohistochemical method. *Histopathology* 2000;37:70-7.

Genetica della celiachia

LUIGI GRECO¹, M. GIOVANNA LIMONGELLI², OSCAR ESPOSITO³, SARA SCOGNAMIGLIO³

¹Dipartimento di Pediatria, Università "Federico II" di Napoli

²Scuola di Specializzazione in Pediatria, Università di Napoli

³Dipartimento di Pediatria, Università di Napoli

GENETICS OF CELIAC DISEASE

(*Medico e Bambino* 2005;24:446-448)

Key words

Celiac disease, HLA genes, MIC-A and MIC-B genes, Candidate genes

Summary

Celiac disease is a multifactorial disease with a large genetic component. Not all genes involved, however, have been identified. The risk of developing celiac disease is higher than 10% in first grade relatives, while concordance among monozygotic twins is higher than 85%. It is known that HLA genes are involved in the pathogenesis of celiac disease. HLA DQ2 is present in 90-95% of celiac patients, while HLA DQ8 in 5-10% of patients. However, both HLA loci can be found in 30-40% of healthy subjects, suggesting that their presence has not a high positive predictive value while their absence has a high negative predictive value. Investigations on the association between HLA DQ2 subtypes and celiac disease identified 3 risk categories with respectively an increased risk of developing celiac disease of 4, 10 and 44%. In order to understand the importance of the genetic component in celiac disease, studies involving chromosome 6, other HLA genes (MIC-A and MIC-B genes) and linkage studies on candidate genes (5q31-33, 11qter) are ongoing.

La celiachia è una malattia multifattoriale con forte componente genetica. Non sono stati ancora identificati tutti i geni coinvolti. Il rischio di celiachia nei familiari di primo grado di un soggetto affetto è superiore al 10%. La concordanza tra gemelli monozigoti, in un recente grande studio di popolazione che ha identificato più di 100 coppie di gemelli, è stata calcolata superiore all'85%, molto vicina a quella osservata sul campo per molte malattie a trasmissione mendeliana¹. La concordanza tra gemelli dizigoti non è significativamente diversa da quella osservata in fratelli non gemelli, suggerendo una moderata partecipazione di fattori ambientali nella genesi della malattia (*Tabella I*).

I GENI DELL'HLA

Questa patologia da glutine è ristretta a specifici geni coinvolti nella risposta immunologica, deputati all'identificazione di antigeni estranei (*Human Leukocyte Antigens*, HLA, cr. 6p21): l'ipotesi patogenetica è che peptidi della gliadina, derivati dalla deaminazione ad opera della transglutami-

nasi tissutale, interagiscano con specifiche molecole dell'HLA, determinando attivazione dei linfociti T intestinali, successivo rilascio di citochine pro-infiammatorie e autoanticorpi, responsabili delle lesioni istologiche della mucosa intestinale. È nota da tempo l'associazione con alcuni alleli dell'HLA DR: DRB1*03, DRB1*05 e DRB1*07. Questi aplotipi sono in linkage disequilibrium con un eterodimero DQ2 (DQab), codificato da una coppia specifica di alleli (DQA1*0501 e DQB1*0201) e presente in circa il 90-95% dei malati. Questa molecola riconosce alcune specifiche sequenze peptidiche della gliadina, suggerendone un ruolo cruciale nella presentazione dell'antigene e quindi nell'attivazione della risposta immune. Negli individui non portatori del DQ2 (5-10% circa) è stato individuato l'eterodimero DQ8, molecola alternativa, costituita dalla stessa catena alfa ma da una differente catena beta (con un notevole grado di omologia con la catena beta già nota, proprio nel sito di legame specifico di legame con il peptide), in linkage con il gene DRB1*04^{2,3}. Ma più del 30-40% degli individui sani non celiaci presenta il DQ2 o il DQ8, dunque la loro pre-

M^eB

Focus

CONCORDANZA DELLA MALATTIA CELIACA IN GEMELLI

	Monozigoti	Dizigoti
Concordanza di coppie (IC 95%)	75% (58.0 - 94.4)	11% (2.4 - 23.9)
Concordanza di casi (IC 95%)	85.7% (68.9 - 98.9)	20% (0.0 - 56.4)

C = coppie concordanti; D = coppie discordanti
Concordanza di coppia = $C/(C+D)$; Concordanza di casi = $2C/(2C+D)$

Tabella I

GENETICA DELLA MALATTIA CELIACA

1. Incidenza: $\approx 1:100$
2. Rischio familiare: 10-14%
3. Rischio genetico relativo (parenti di 1° grado/popolazione generale) = $14\%/1\% = 14$
4. Tasso di concordanza tra gemelli monozigoti: $> 85\%$
5. Tasso di concordanza tra gemelli dizigoti: 18% (non differente da fratelli non gemelli)
6. HLA di classe II:
90-95% hanno il DQ2 (in linkage con DR3 in *cis* e con DR5-DR7 in *trans*)
5-10% hanno il DQ8 (in linkage con DR4)

Tabella II

QUALI INFORMAZIONI FORNISCE L'ANALISI DELL'HLA

- Se sono assenti HLA DQ2 o DQ8: nessuna possibilità di sviluppare la malattia
- Se sono presenti: la malattia è possibile, ma il 30-35% della popolazione generale e il 60-70% dei parenti di primo grado hanno questi aplotipi senza avere la malattia

L'HLA spiega non più del 30% del rischio genetico

Tabella III

VALUTAZIONE DELL'HLA: MESSAGGIO PER IL PAZIENTE

1. HLA sconosciuto, nessun caso familiare	1% di rischio
2. HLA DQ2 o DQ8 assenti	0% di rischio
3. HLA DQ2 o DQ8 presenti	2.5% di rischio
4. HLA sconosciuti, casi familiari nei parenti di primo grado	10-14% di rischio
5. Parenti di primo grado con DQ2 o DQ8	20% di rischio

Tabella IV

senza non ha valore predittivo positivo, mentre l'assenza ha un alto valore predittivo negativo (Tabelle II, III, IV).

ULTERIORI ANALISI DEL RISCHIO ASSOCIATO ALL'HLA

All'interno della categoria di familiari di 1° grado non affetti che ha il DQ2 (e dunque un rischio di partenza di circa il

20% di fare la malattia) esistono vari sottogruppi di rischio, a seconda del linkage del DQ2 con sottotipi diversi del DR.

La Tabella V mostra queste classi di rischio: avere una doppia dose di DQB1*0201, come nei casi che hanno DR3/DR3 o DR3/DR7 raddoppia il rischio dal 20% al 40% o più, ma anche avere una sola dose di DQB1*0201 (il DQ2) in linkage con DR5/DR7 produce un rischio doppio rispetto al rischio di base.

Avere una sola dose di DQ2, come nel DR3/DRX, produce un dimezzamento del rischio di base. Non avere il DQ2 ma il DQ8 porta il rischio del familiare dal 20% a circa il 4%.

In conclusione si può, dalla nascita, classificare il rischio di un fratellino o di un figlio di un paziente celiaco in almeno 3 classi di rischio, che predicano dal 4 al 10 al 44% di rischio di sviluppare la malattia⁴.

Sottotipi di DQ2

Ma anche all'interno della molecola di HLA DQ2, che è prodotta dal gene DQB1*02, esistono due sottotipi: DQB1*0201, sempre legato al DR3, e il DQB1*0202 legato al DR7. Queste due proteine hanno una piccola differenza, importante dal punto di vista funzionale: una prolina in posizione P3 nella tasca ove viene riconosciuto l'antigene. Se è presente questa prolina in P3 nel DQ2*0201 la molecola è capace di riconoscere circa il doppio dei peptidi della gliadina rispetto alla sua simile molecola senza la prolina in P3, denominata DQ2*0202.

Sembra che anche la risposta di stimolazione gliadino-specifica dei linfociti T è differente a seconda di questa minuscola differenza molecolare.

La Figura 1 conferma che avere due dosi di DQB1*02 (sia per la presenza di DR3/DR3 sia per DR3/DR7) raddoppia la capacità dell'HLA di riconoscere peptidi specifici della gliadina e di stimolare cellule T gliadino-specifiche. Dunque individui con rischio genetico in doppia dose, eventualmente in associazione ad altri profili genetici a rischio, superano più facilmente la soglia di stimolazione di cellule T capaci di avviare la patogenesi autoimmune della celiachia⁵.

Rischi associati a geni del cromosoma 6 oltre all'HLA

MICA-A5.1, MICB-CA24 e MIB-350 sono alleli caratteristici dell'aplotipo esteso B8-DR3-DQ2: i soggetti DR3 portatori di questa combinazione di alleli hanno un rischio di ammalarsi circa 4 volte maggiore dei soggetti DR3 portatori di altri profili allelici. Le molecole prodotte dai geni MICA e MIC-B sono proteine dello stress cellulare coinvolte nella fase di immunità naturale dopo l'esposizione al glutine. L'aplotipo MICA-A5.1 produce una molecola troncata nella sua ancora di membrana che interagisce con antigeni in modo diverso dalla molecola ancorata alle membrane⁶.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO ASSOCIATO ALL'HLA

DQ	DR	Casi (%)	Rischio	Casi (n)	Rischio pesato	RR 24%
2	3/3-3/7	0,26	1	33	0,26	47,27
2	5/7	0,37	0,68	47	0,2516	45,75
2	3/X	0,24	0,23	30	0,0552	10,04
8	4/4-4/7-7/7	0,06	0,27	8	0,0162	2,95
x	Altro (1-5)	0,08	0,02	10	0,0016	0,29
Totale		1,01	2,2	127	2,2	
Media			0,733333		0,11692	21,26

$Rischio\ pesato = (Rischio \times casi) / 127$; $RR\ 24\% = (Rischio\ pesato \times 24) / Rischio\ medio$
Da voce bibliografica 4, modificata

Tabella V

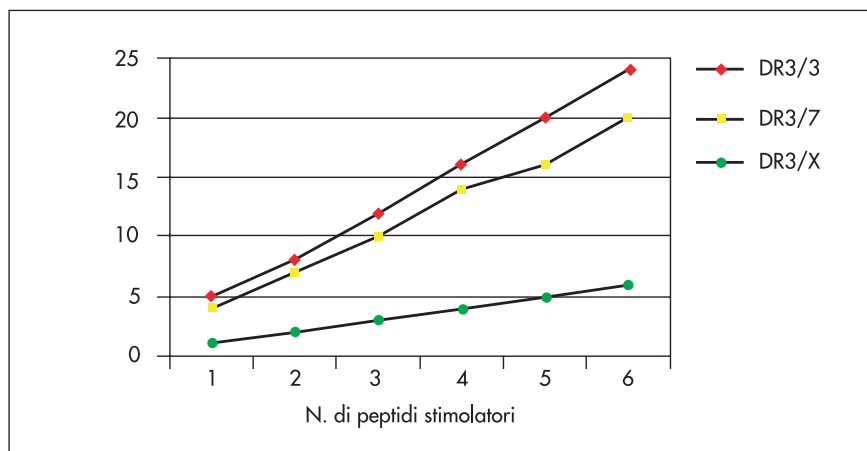


Figura 1. Sottotipi di Q2 e aumento della capacità di riconoscimento di peptidi gliadinici che attivano la risposta T-specifica.

RICERCA DI GENI CANDIDATI MEDIANTE STUDI DI LINKAGE

Circa il 25-40% della componente genetica della malattia è attribuibile ai geni dell'HLA, vi è dunque ancora una notevole componente genica da identificare. Per cercare geni al di fuori della zona dell'HLA abbiamo condotto uno screening con microsatelliti sul genoma umano, cercando il linkage tra marcatori genetici ripartiti su tutto il genoma e la malattia. Un primo studio su un campione di 120 famiglie con due figli affetti, italiani, ha localizzato almeno due "zone calde" che mostravano un linkage significativo con la malattia celiaca. Infatti la zona 5q31-33 e quella dell'11qter hanno prodotto risultati significativi⁷.

La presenza di una zona calda nella regione 5q31-33 è stata successivamente confermata in un secondo studio di screening genomico su altre 110 famiglie italia-

ne. La replicazione del linkage ha dunque rafforzato l'ipotesi che la regione 5q31-33 contenga geni candidati per la celiachia.

Recentemente il Consorzio Europeo per la ricerca dei geni della celiachia (EU-Cluster GENETICS) ha permesso di confermare in altri 4 set indipendenti di famiglie europee la positività del linkage nella regione 5q31-33.

Sono state inoltre identificate altre zone calde sul cromosoma 11qter e nella zona del gene che codifica per il CTLA4 sul cromosoma 2. In realtà nella popolazione italiana il gene del CTLA4 è normale nei celiaci rispetto ai controlli, ma esiste, in diverse popolazioni europee, un linkage specifico con la zona ove è codificato questo gene, ove risiedono i fattori di regolazione, i fattori post-trascrizionali e i geni associati alla funzione di questa proteina, che ha come effetto finale la tenuta sotto controllo dell'azione "lesiva" della cellula T^{8,9}. In pratica il celiaco ha una cellula T

con "pochi freni" e reagisce "eccessivamente" alla stimolazione causata dai peptidi del glutine.

Questo lavoro è stato molto più complesso di quanto si potesse prevedere e non ha prodotto immediati risultati forse per una ragione interessante: nella celiachia non sembra che vi siano "geni alterati" o "mancanti" rispetto ai soggetti non celiaci. Sembra infatti che tutto "funzioni bene" e che invece si tratti di "un popolo", una tribù, caratterizzata da un sistema di difesa HLA molto efficace, ma "ingannato" dal glutine, e da altre caratteristiche geniche che definiscono "il tipo di individuo" piuttosto che il gene-malattia.

Bibliografia

1. Greco L, Romino R, Coto I, et al. The first large population-based twin study of celiac disease. *GUT* 2002;50(5):624-8.
2. Clot F, Gianfrani C, Greco L, Babron MC, Bouguerra F, Southwood S, et al. HLA-DR53 molecules are associated with susceptibility to celiac disease and selectively bind gliadin-derived peptides. *Immunogenetics* 1999;49:800-7.
3. Greco L, Corazza G, Babron MC, et al. Genome Search in Celiac Disease. *Am J Hum Genet* 1998;62:669-75.
4. Margaritte-Jeannin P, Babron MC, Bourgey M, et al. HLA DQ relative risk for coeliac disease in European populations: a study of the European Genetic Cluster on Coeliac Disease. *Tissue Antigen* 2004;63:562-7.
5. Vader W, Stepniak D, Kooy Y, et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *PNAS* 2003;100(21):12390-5.
6. Bolognini E, Karel K, Percopo S, et al. Additional factor in some HLA DR3/DQ2 haplotypes confers a fourfold increased genetic risk of celiac disease. *Tissue Antigens* 2003;61:308-16.
7. Greco L, Babron MC, Corazza GR, et al. Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian Celiac Disease families. *Ann Hum Genet* 2001;65(Pt 1):35-41.
8. Nalwai AT, Nilsson S, Samuelsson L, et al. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens* 2000;56:350-5.
9. King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid AM, Dearlove AM, Ellis HJ, Ciclitira P. CTLA4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet* 2002;39:51-4.

Screening e malattia celiaca

TARCISIO NOT

Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università di Trieste e IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

CELIAC DISEASE AND SCREENING

(Medico e Bambino 2005;24:449-450)

Key words

Population based screening, High risk group screening

Summary

From the clinical and the epidemiological point of view, celiac disease may represent an appropriate disease model to apply a population based screening strategy. In the literature, the use of human tTG antibodies is described as an efficient screening strategy both in high risk groups and in family "case finding" series. However, population based screening is still a matter of debate, since it is yet not clear which is the most appropriate age when performing the screening and which motivations to offer to those subjects positive at the screening but still asymptomatic. It has been suggested to first identify subjects at risk by neonatal determination of HLA DQ2/DQ8 and to follow them up with periodical serological tTG tests in order to identify early celiac patients.

La malattia celiaca presenta tutte le caratteristiche epidemiologiche e cliniche che giustificano l'applicazione di uno screening di popolazione per identificare precocemente i soggetti affetti da tale patologia. Infatti l'elevata prevalenza (1% della popolazione generale); l'elevato rischio di mortalità e morbilità tra celiaci tardivamente diagnosticati; la disponibilità di test sierologici (anticorpi di classe IgA e IgG anti-transglutaminasi umana) non invasivi, di basso costo, sensibili (98%) e specifici (95%) in grado di identificare soggetti sintomatici e asintomatici; la disponibilità di una terapia efficace e la spesa a carico del sistema sanitario per tutti gli interventi medico-assistenziali a causa di una mancata diagnosi di celiaci, soddisfano pienamente i criteri necessari alla progettazione e realizzazione di uno screening di popolazione¹. Attualmente sono presenti due livelli di screening per la malattia celiaca: il primo riguarda i gruppi a rischio (familiari di primo grado di celiaci e soggetti con malattie autoimmuni, in particolare il diabete tipo 1); il secondo è rivolto ai soggetti con sintomi indicativi di una intolleranza al glutine ma estremamente differenti da quelli fino ad ora considerati tipici della celiachia (ad esempio astenia, anemia resistente alla terapia

marziale, atassia, osteopenia, epilessia farmaco-resistente). Fino a qualche anno fa, questi due tipi di intervento costituivano materia di ricerca clinica-epidemiologica ristretta ad alcuni centri; ora invece sono considerati interventi di buona pratica medica nelle mani di

tutti i medici, in particolar modo del medico di medicina generale^{2,3}. In discussione rimane l'opportunità di organizzare screening di massa tra la popolazione generale per identificare i soggetti asintomatici in modo da prevenire lo sviluppo di patologie glutine-dipendenti. Le obiezioni a quest'ultimo intervento riguardano l'assenza di una età sicura in cui iniziare lo screening sierologico e la motivazione alla dieta senza glutine dei celiaci asintomatici identificati dai test sierologici⁴.

Una risposta certa al primo punto non esiste ancora. Recentemente, uno studio prospettico, basato sulla determinazione semestrale degli anticorpi anti-transglutaminasi a partire dal primo anno di vita in bambini positivi agli HLA DQ2/8, ha dimostrato che il terzo anno di vita è il momento più frequente per la comparsa degli anti-transglutaminasi di classe IgA in soggetti celiaci (Figura 1)⁵. Tuttavia questo studio non permette di concludere se i bambini costantemente negativi durante tutta la durata dello studio (5 anni) possono essere considerati sicuramente liberi dall'intolleranza al glutine o se invece potranno sviluppare più tardivamente una risposta immunologica glutine-dipendente. Lo studio ha il merito di aver indicato nella determinazione neonatale dell'HLA DQ2/8, uno strumento

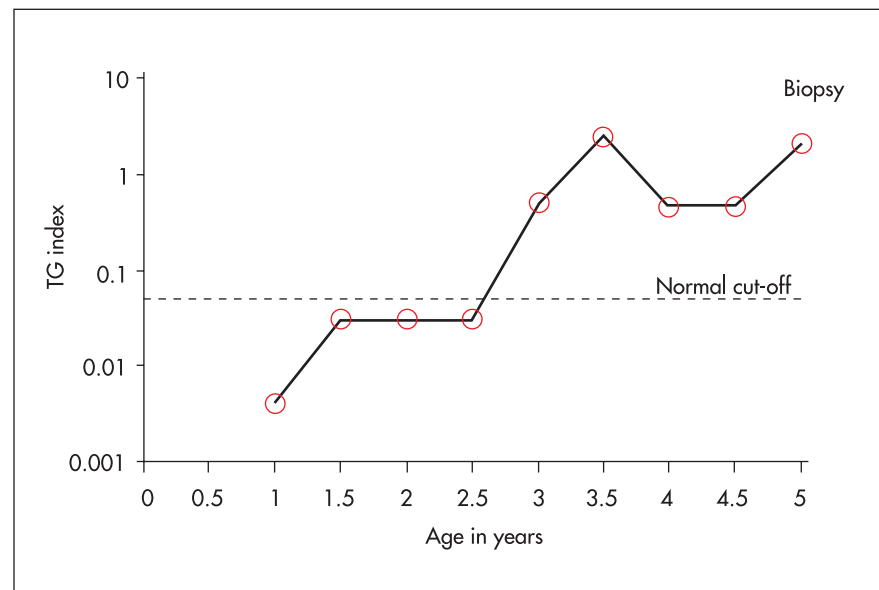


Figura 1. Modificazione temporale degli anticorpi sierici IgA anti-transglutaminasi in un gruppo di bambini positivi per l'HLA DQ2 e diagnosticati celiaci con la biopsia intestinale immediatamente dopo la sieroconversione anticorpale. Come si può vedere, la sieroconversione cade entro il terzo anno di vita.

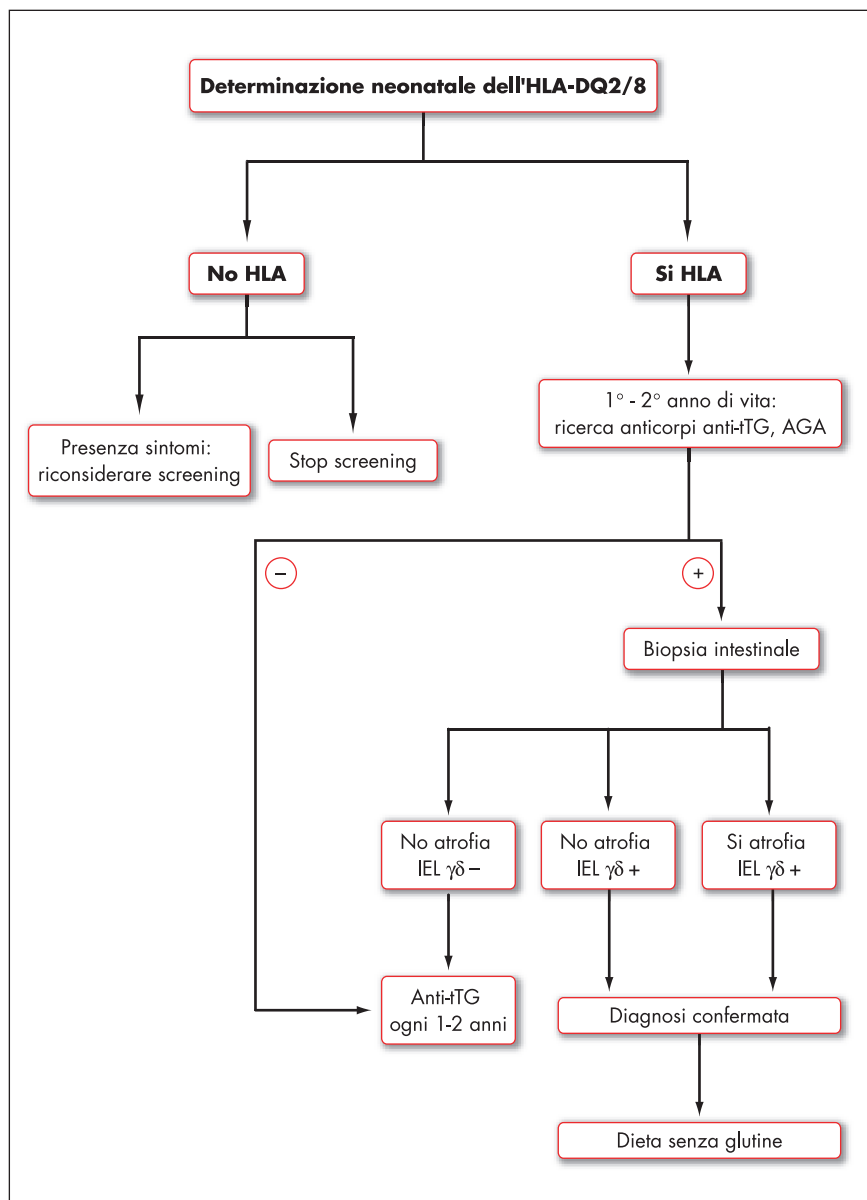


Figura 2. Algoritmo per lo screening della malattia celiaca basato sulla selezione genetica della popolazione e sul follow-up sierologico dei soli soggetti portatori dell'HLA DQ2/8. L'associazione degli anticorpi anti-transglutaminasi e anti-gliadina (AGA) sarebbe riservata ai soggetti con età inferiore ai due anni, per garantire una elevata sensibilità diagnostica.

di selezione preliminare dei soggetti a rischio e nel proporre un follow-up sierologico (della durata ancora da definire) per identificare precocemente i soggetti celiaci (Figura 2).

La seconda obiezione parte dal presupposto che i celiaci asintomatici, a differenza dei sintomatici, siano poco motivati all'esecuzione della dieta senza glutine per il fatto che l'introduzione del glutine, a causa di errori dietetici o di trasgressioni volontarie, general-

mente non produce sintomi o generico malessere tali da giustificare una rigorosa dieta. Su questo argomento, l'esperienza della maggioranza dei gruppi di lavoro dimostrerebbe una buona aderenza alla dieta dei celiaci asintomatici sia dal punto di vista sierologico (negatività degli anticorpi anti-transglutaminasi) che soggettivo. A questo riguardo risulta significativa la testimonianza di alcuni celiaci asintomatici che dichiarano un inaspettato miglio-

MESSAGGI CHIAVE

- La malattia celiaca può essere considerata per caratteristiche clinico-epidemiologiche un modello di patologia su cui è possibile applicare con efficacia una metodica di screening.
- È ancora discussa l'opportunità di organizzare screening di massa fra la popolazione generale per identificare i soggetti asintomatici in modo da prevenire le patologie correlate all'esposizione al glutine.
- In particolare i punti in discussione sono quelli dell'età a cui proporre lo screening e la motivazione nell'aderire alla dieta dei soggetti asintomatici.
- Lo screening tra i gruppi a rischio o per "case finding" è invece uno strumento di buona pratica medica e di dimostrata efficacia nella prevenzione di patologie glutine-dipendenti.

mento della qualità di vita durante la dieta rispetto al periodo della dieta contenente glutine⁶.

In conclusione, l'opportunità di realizzare lo screening di massa per la malattia celiaca rimane ancora un problema aperto mentre lo screening tra i gruppi a rischio o per "case finding" costituisce uno strumento di buona pratica medica e di sperimentata efficacia nella prevenzione di patologie glutine-dipendenti.

Bibliografia

1. Fasano A. European and North American populations should be screened for coeliac disease. *Gut* 2003;52:168-9.
2. Hin H, Bird G, Fisher P, Mahy N, Jewell D. Coeliac disease in primary care: case finding study. *BMJ* 1999;318:164-7.
3. Ventura A, Facchini S, Amantidu S, et al. Searching for celiac disease in pediatric general practice. *Clin Pediatr* 2001;40:575-7.
4. Young EH, Wareham NJ. Screening for coeliac disease: what evidence is required before population programmes could be considered. *Arch Dis Child* 2004;89:499-501.
5. Hoffenberg EJ, MacKenzie T, Barriga KJ, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143:308-14.
6. Mustalahti K, Lohiniemi S, Collin P, et al. Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. *Eff Clin Pract* 2002;5:105-13.

Le molecole della celiachia: peptidi tossici ed endopeptidasi

GARY M. GRAY

Dipartimento di Gastroenterologia, Università di Stanford, California (USA)

THE ROLE OF TOXIC PEPTIDES AND ENDOPEPTIDASES IN CELIAC DISEASE (Medico e Bambino 2005;24:451-452)

Key words

33-mer peptide, Prolyl endopeptidase, Gliadin peptides

Summary

Many gluten peptides elicit T cell-proliferative responses in celiac patients. These peptides are rich in proline and glutamine residues and so extremely resistant to proteolysis. This resistance is related to their toxicity. A 33-mer peptide was identified as the primary initiator of the inflammatory response to gluten in celiac disease. In vitro and in vivo studies demonstrated its stability towards breakdown by all gastric, pancreatic and intestinal brush-border membrane proteases. This peptide reacts with tissue-transglutaminase with impressive selectivity and it is a potent inducer of gut-derived human T cells from celiac patients. Homologs of this peptide were found in all food grains that are toxic for celiacs but are absent from all non-toxic foods. The 33-mer peptide is detoxified by exposure to a bacterial prolyl endopeptidase, suggesting a strategy for oral peptidase supplement therapy for celiac disease in alternative to the gluten-free diet. A clinical trial to test the efficacy in vivo of endopeptidase added to gluten in preventing its multiform toxicity is ongoing.

Nonostante il prof. Gray non abbia potuto inviarmi un suo scritto, riteniamo l'argomento in questione estremamente originale e innovativo; pertanto riportiamo una sintesi del lavoro del prof. Gray e dei suoi collaboratori in merito.

Un campo di ricerca estremamente stimolante dal punto di vista scientifico e carico di interesse per l'opinione pubblica è rappresentato dagli esperimenti volti a individuare un

mezzo per ridurre o annullare la tossicità del glutine, trovando per la celiachia una terapia alternativa alla dieta senza glutine.

Negli scorsi anni sono stati identificati i due principali epitopi immunodominanti dell'alfa-gliadina, responsabili della proliferazione T-linfocitaria intestinale e periferica caratteristica dei soggetti celiaci. Questi due epitopi sono esposti da diversi peptidi originatisi dalla gliadina e sono molto ricchi in

residui di prolina e glutamina. Questi peptidi gliadinici sono stati sottoposti a proteolisi in vitro, ad opera di proteasi derivate da pancreas bovino e porcino e dall'orletto a spazzola dell'intestino di ratto. L'esperimento ha dimostrato la loro straordinaria resistenza alla digestione enzimatica "fisiologica" ma venivano idrolizzati da un'endopeptidasi batterica¹.

Successive indagini hanno identificato un peptide denominato 33-mer con le seguenti caratteristiche:

- resistente alla digestione da parte delle proteasi gastriche, pancreatiche e intestinali
- ricco in prolina e glutamina
- in qualche modo si lega e reagisce con la transglutaminasi tissutale
- è capace di stimolare la proliferazione dei linfociti T dei soggetti celiaci (Figura 1)

Questo peptide rappresenta appunto un substrato della transglutaminasi tissutale, il principale autoantigene riconosciuto nella celiachia, con una selettività molto superiore rispetto ad altri substrati naturali di questo enzima extracellulare. Omologhi di questo peptide sono stati riconosciuti nei cereali e nei loro derivati in grado di produrre tossicità ai celiaci mentre erano assenti negli alimenti senza glutine. Il peptide 33-mer può essere detossificato esponendolo a una proli-endopeptidasi batterica. Quest'ultima evidenza potrebbe fornire la base per una strategia di detossificazione del glutine mediante supplementazione orale con endopeptidasi nei celiaci².

Il passaggio ulteriore è stato quello di cercare un modello animale per verificare la fattibilità di questo mecca-

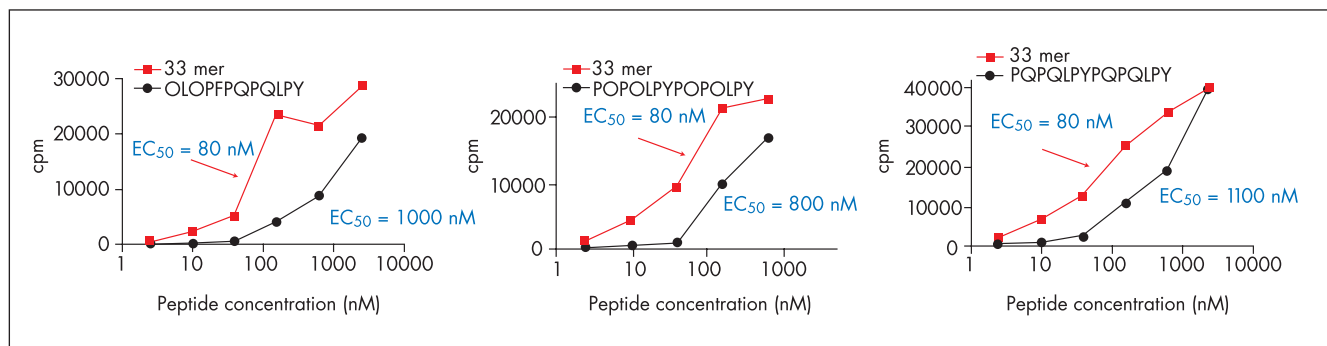


Figura 1. L'effetto proliferativo sui linfociti T derivati da soggetti celiaci da parte del peptide 33-mer, confrontato con quello di un altro peptide derivato dalla gliadina, meno ricco in prolina e glutamina.

MESSAGGI CHIAVE

- I due epitopi principali dell'alfa-gliadina, responsabili della proliferazione T-linfocitaria intestinale e periferica del celiaco, sono esposti da diversi peptidi originatisi dalla gliadina e sono molto ricchi in residui di prolina e glutamina.
- Il peptide 33-mer è il principale di questi peptidi ed è uno dei substrati della transglutaminasi umana tissutale, con la più alta selettività rispetto ad altri substrati naturali.
- L'esposizione del peptide 33-mer a una prolil-endopeptidasi batterica potrebbe detossificare il glutine senza necessariamente escluderlo dalla dieta del celiaco.
- Evidenze in vitro e studi in vivo ancora in corso dimostrerebbero che la digestione con endopeptidasi del principale peptide gliadinico, che scatena la risposta auto-anticorpale nel soggetto celiaco, può controllare ed evitare i fenomeni immunopatologici alla base della malattia.

simo. L'endopeptidasi ricombinata è stata infusa nell'intestino di ratto insieme al peptide 33-mer altamente resistente alla digestione fisiologica (nel rapporto endopeptidasi:peptide da 1:50 a 1:5). È stata ridotta in modo significativo la durata della presenza del peptide nell'intestino. Sembrerebbe quindi che i peptidi gliadinici resistenti alla proteolisi possano essere processati efficientemente anche in vivo dalla supplementazione con endopeptidasi, che quindi potrebbe essere proposta nella terapia della malattia celiaca con l'obiettivo di eliminare lo stimolo rappresentato dal glutine senza necessariamente escluderlo dalla dieta³.

Attualmente è in corso il primo trial clinico per valutare l'efficacia clinica della detossificazione del glutine mediante la prolil-endopeptidasi batterica. In un fase preliminare dello studio, 8 soggetti celiaci in remissione con la dieta senza glutine sono stati sottoposti a un challenge con 5 g/die o 10 g/die di glutine per 21 giorni, che ha dimostrato l'induzione di malassorbimento clinicamente non evidente ma dimostrabile con la valutazione della xilosuria e dei grassi fecali. È stata confermata l'inutilità de-

gli anti-tTG per monitorare un test di scatenamento acuto. Quindi è stato avviato il trial clinico, tutt'ora in corso, con altri 14 celiaci in remissione. Sono randomizzati in due gruppi con disegno cross-over; per 2 settimane un gruppo ha assunto 5 g/die di glutine da solo mentre l'altro gruppo ha assunto 5 g/die di glutine + 200 UI di endopeptidasi/grammo di glutine.

L'obiettivo è quello di valutare se in vivo la digestione con endopeptidasi, e quindi la distruzione del principale peptide gliadinico scatenante la malattia celiaca, possa controllare e prevenire del tutto i fenomeni immunopatologici di base.

Bibliografia

1. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G996-G1003.
2. Shan L, Molberg O, Parrot I, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.
3. Piper JL, Gray GM, Khosla C. Effect of prolyl endopeptidase on digestive-resistant gliadin peptides in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:213-9.

Sulle pagine elettroniche (www.medicoebambino.com) è riportato il lavoro di Greco L, et al. sui dati sperimentali relativi alla possibile riduzione della tossicità del glutine predigerendolo con proteasi.

Pane senza glutine

CORRADO FOGHER

Istituto di Botanica e Genetica vegetale, Università Cattolica S. Cuore, Facoltà di Agraria, Piacenza

GLUTEN FREE BREAD

(*Medico e Bambino* 2005;24:452-455)

Key words

Gluten, Gliadine, Wheat genome, Wheat gene modifications

Summary

Many celiac patients find gluten free diet not tasty and difficult to follow rigorously. It is therefore auspicious to develop new gluten-free food products which taste better, including bread. Several attempts of gene modifications in order to eliminate allergic peptides from wheat have been made but unfortunately they did not lead to any significant result, given the complexity of wheat genome and the presence of a high number of toxic peptides. Ongoing experiments which genetically combine a non-allergic cereal (rice) with those wheat proteins which are necessary for the baking process, represent a new potential winning approach.

I cereali, con l'esclusione del riso, costituiscono la fonte alimentare principale delle popolazioni occidentali e nord americane, fornendo carboidrati complessi, fibre, proteine, sali minerali e vitamine¹.

In questi Paesi un numero significativo di bambini e adulti sono geneticamente suscettibili e non possono tollerare cereali quali frumento, segale, triticale e orzo, dal momento che sviluppano una risposta immunitaria al glutine presente nella dieta. In questi pazienti alcune delle proteine e peptidi derivati dalla digestione del glutine

scatenano una serie di processi patofisiologici che possono portare ai danni tipici dell'epitelio intestinale con deficienze di assorbimento². La prevalenza della malattia, con sintomi evidenti, varia considerevolmente nei diversi Paesi ed è stimata a una incidenza dello 0,3% nella popolazione europea. A dispetto della sua diffusione non esiste una terapia eccetto l'esclusione, per tutta la vita, del glutine dalla dieta³.

La componente maggiore del glutine è costituita da due gruppi di proteine, le gliadine e le glutenine, presenti nell'endosperma dei cereali sopra

menzionati, con particolare riferimento al frumento⁴. Le gliadine sono subunità monomeriche di peso molecolare variabile da 36 a 78 kDa, suddivise in diverse classi (α -, β -, γ -, ω -gliadine) e alcuni peptidi, presenti in particolare nelle α -gliadine, sono la causa della risposta immunitaria nella celiachia⁵. Le glutenine invece comprendono subunità a basso (LMW) e ad elevato (HMW) peso molecolare; quelle a basso peso molecolare hanno dimensioni che variano da 30 a 45 kDa, mentre quelle a elevato peso molecolare variano da 90 a 120 kDa⁶. Le glutenine HMW hanno delle proprietà uniche, tra le proteine dei cereali, che consentono la preparazione di impasti viscosi ed elastici in grado di trattenere l'anidride carbonica prodotta dai lieviti e quindi di lievitare⁷.

Prove archeologiche hanno mostrato che la domesticazione del frumento da parte dell'uomo neolitico avvenne nel centro di distribuzione dei progenitori selvatici del frumento, nella parte nordorientale della mezzaluna fertile (Iran, Iraq, Turchia) e da qui poi, grazie alla sua plasticità genetica, si è diffuso in tutto il mondo.

La variabilità genetica dei frumenti coltivati, che si è accumulata in più di 10.000 anni di attività umana, è andata diminuendo con l'introduzione di pratiche di incrocio moderne e scientificamente programmate. I frumenti oggi coltivati appartengono a tre specie del genere *Triticum*, che contengono tutte qualche multiplo della serie aploide di 7 cromosomi. La specie con il numero più basso di cromosomi, *T. monococcum*, ha un corredo diploide di 14 cromosomi, *T. durum* è tetraploide con 28 cromosomi e *T. aestivum* è esaploide con 42 cromosomi.

Delle tre forme di frumento coltivate il *T. aestivum* è quello economicamente più importante e le varietà moderne, definite come frumento tenero, sono più di 20.000 e adattate ad ambienti molto diversi. La struttura genetica delle specie poliploidi di *Triticum* fa sì che la maggior parte dei loci genici è presente in quattro o sei "dosi" e l'accumulo di variazione genetica attraverso la mutazione è maggiormente tollerato che in una specie diploide. Così la poliploidia facilita la diploidizzazione genetica, un processo per

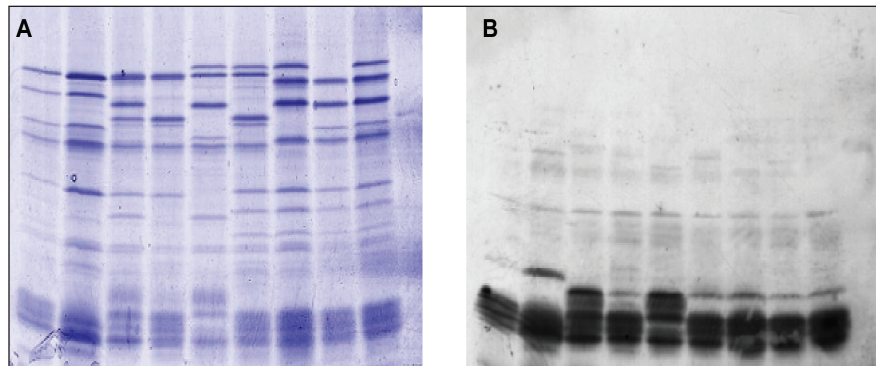


Figura 1. Verifica del riconoscimento delle glutenine HMW, da parte del siero di pazienti celiaci, eseguito su proteine purificate da diverse varietà di frumento e separate mediante SDS-PAGE. A: colorazione delle proteine con Comassie blu; B: analisi Western delle proteine di A (le bande in alto corrispondono alle glutenine HMW, quelle in basso alle gliadine).

mezzo del quale i geni presenti in dosi multiple, anche elevate, possono acquisire nuove funzioni. Da qui si comprende il diverso ed elevato numero dei geni gliadinici presenti nelle forme coltivate, che raggiunge il numero di qualche centinaio e che ha impedito la selezione di frumenti ipoallergenici.

Parte delle caratteristiche elastiche della rete proteica formata dal glutine dipendono dal dominio centrale ripetitivo delle glutenine ad elevato peso molecolare (HMW) che costituiscono il 60-80% della loro sequenza aminoacidica e comprende i peptidi PGQGQQ, GYYPTS(P/L)QQ e GQQ. Nelle gliadine invece le sequenze peptidiche che sono state riconosciute come epitopi specifici sono PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ, PYPQPQLPY, ecc.⁸. La formazione dei legami intercatena è invece garantita dalla presenza dei residui di cisteina nelle regioni N- e C-terminali delle glutenine HMW che consentono la formazione di ponti disolfuro. Che non partecipino solo l'enzima disolfito isomerasi alla formazione dei legami intercatena, ma anche una transglutaminasi della pianta, è suggerito dalla presenza, sempre in posizione N- e C-terminale delle glutenine HMW, di residui di lisina indispensabile nella formazione dei legami glutamina-lisina operati dalla transglutaminasi⁹. A ulteriore sostegno di questa ipotesi vi è l'individuazione della presenza di una sequenza aminoacidica altamente conservata nella parte C-terminale di tutte le glutenine HMW che contiene due residui di lisina.

Allo scopo di ingegnerizzare un

nuovo cereale che presenti le caratteristiche panificatorie del frumento e le caratteristiche di ipoallergenicità del riso abbiamo deciso di percorrere una strada diversa da quella tentata fino ad ora, che consisteva nel selezionare varietà di frumento prive delle componenti gliadine allergiche, e che non ha portato a risultati apprezzabili. Questa nuova strada prevedeva il trasferimento in riso delle proteine di frumento, importanti per la determinazione della caratteristica di lievitazione, ma prive degli epitopi riconosciuti come allergici per i pazienti celiaci. Nel caso comunque che le sequenze gluteniniche scelte, per il trasferimento in riso, presentassero sequenze aminoacidiche riconosciute come allergiche dai celiaci (Figura 1), queste sono state modificate con tecniche di ingegneria proteica che consentono la sostituzione di alcuni aminoacidi nelle posizioni desiderate. Inoltre, al fine di promuovere la formazione di una rete proteica nell'impasto ottenuto dalla farina del nuovo cereale, abbiamo introdotto anche il gene codificante per l'enzima transglutaminasi.

Le sequenze delle 10 glutenine a elevato peso molecolare che abbiamo scelto per il trasferimento in riso sono state clonate da frumento mediante tecnica PCR, sfruttando le informazioni di sequenza presenti nelle banche dati del DNA. Il gene per la transglutaminasi è stato invece clonato, mediante RT-PCR, a partire da mRNA purificato dal fegato di criceto.

Le piante di riso trasformate con i geni di frumento, dopo rigenerazione

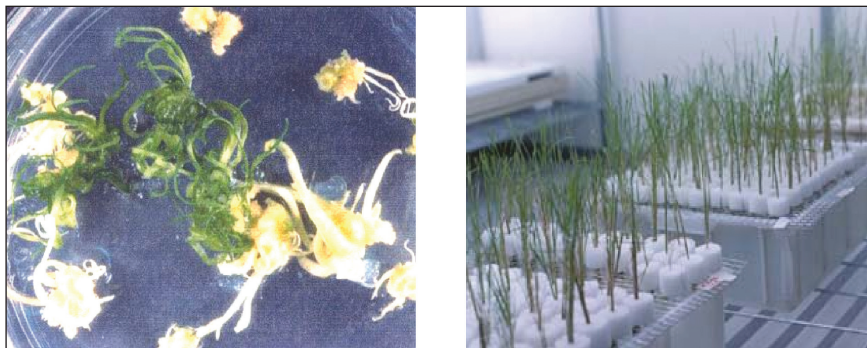


Figura 2. Germogli di riso rigenerati *in vitro* (sinistra) dopo la trasformazione genetica dei calli e fase di acclimatazione (destra) delle piantine complete in coltura idroponica prima del trasferimento in serra.

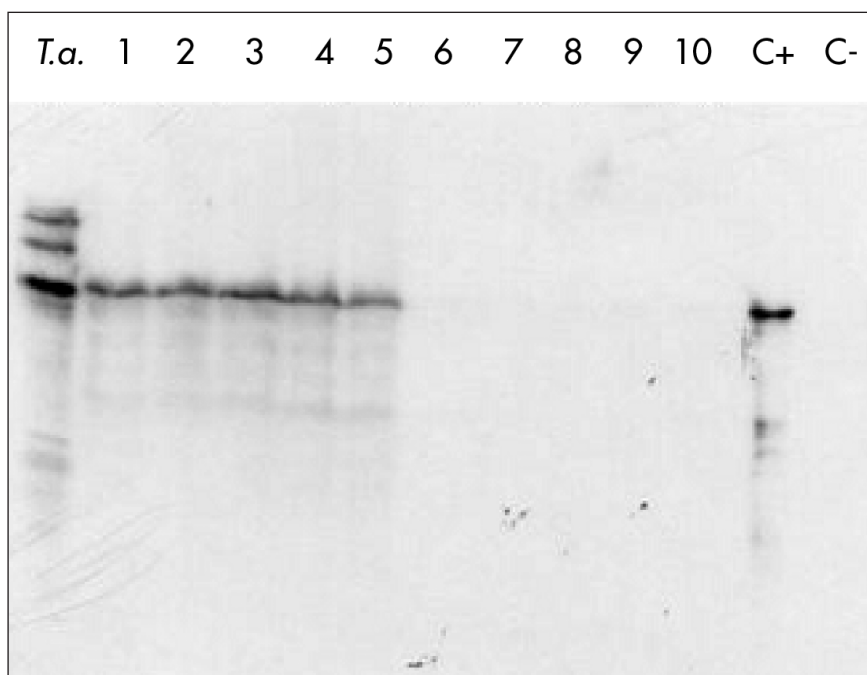


Figura 3. Risultati dell'analisi Western eseguita, con un anticorpo specifico per la proteina di frumento 1Dy10, su proteine totali estratte da seme di riso. T.a.: proteine estratte da *Triticum aestivum* cv Cheyenne. 1-10: proteine estratte da seme di riso transgenico; C+ controllo positivo (1Dy10 da *E. coli*); C- controllo negativo (proteine da *Oryza sativa* cv Rosa Marchetti).

(Figura 2), sono state controllate a livello molecolare per verificare la presenza dei transgeni, la loro funzionalità e l'effettivo accumulo della proteina di frumento nel seme di riso. Un esempio del controllo eseguito con tecnica Western sulle proteine totali estratte da riso è riportato in Figura 3.

CONCLUSIONI

Molti pazienti celiaci trovano la dieta priva di glutine poco gradevole e

questo determina difficoltà nel seguirla rigorosamente. Vi è quindi la necessità di sviluppare nuovi preparati, specialmente nei prodotti da forno, per stimolare una più stretta osservanza dell'unica alternativa terapeutica per questa malattia.

La selezione di un frumento privo di peptidi allergici sarebbe una buona alternativa alla dieta priva di glutine ma, nonostante i numerosi tentativi eseguiti con il miglioramento genetico e la modifica genetica del frumento, non si è giunti a risultati pratici. Questo in-

MESSAGGI CHIAVE

□ La componente maggiore del glutine è costituita da due gruppi di proteine, le gliadine e le glutenine. Le varie subunità delle gliadine (in particolare l' α -gliadina) sono la causa della risposta immunitaria nel soggetto celiaco. Le glutenine hanno proprietà uniche che consentono la preparazione di impasti viscosi ed elastici che trattengono l'anidride carbonica e permettono quindi la lievitazione.

□ La variabilità genetica dei frumenti coltivati è andata diminuendo con l'introduzione di pratiche d'incrocio moderne e scientificamente programmate. In particolare l'utilizzo di frumenti con patrimonio genetico poliploide e quindi con un elevato numero di geni gliadinici ha impedito nel tempo la selezione di frumenti ipoallergenici.

□ La complessità del genoma del frumento e la compresenza di numerose proteine tossiche rendono difficile la selezione di un frumento privo di peptidi allergici.

□ Utilizzando invece come cereale non allergico il riso e modificando le sue proprietà tecnologiche, si è riusciti a introdurre proteine del frumento non tossiche e importanti in termini qualitativi per la panificazione. Le verifiche su questi nuovi tipi d'impasto dimostrano la capacità di queste di trattenere i gas prodotti dai lieviti e di non contenere epitopi conosciuti come allergici.

successo dipende dalla complessità del genoma del frumento, cinque volte più grande di quello umano, e dal grande numero di proteine tossiche presenti¹⁰.

Noi abbiamo seguito un approccio differente utilizzando un cereale non allergico come background e modificando le sue proprietà tecnologiche introducendo proteine di frumento importanti in termini qualitativi per la panificazione. Per la scelta delle proteine di frumento da trasferire in riso ci siamo basati su diversi parametri quali: sequenza aminoacidica primaria, assenza di epitopi conosciuti come allergici, presenza dell'aminoacido lisina, importanza strutturale della proteina ecc. Per ampliare i dati disponibili sulla tossicità delle proteine di frumento abbiamo verificato decine di campioni di siero di pazienti celiaci su gliadine, glu-

tenine HMW e LMW di numerose varietà di frumento tenero, mediante analisi Western, sia con tecniche elettroforetiche monodimensionali che 2D. Tutte le glutenine scelte per l'espressione in riso presentano 5 residui di lisina disponibili per le reazioni di cross-linking catalizzate dall'enzima transglutaminasi e due di questi sono in una posizione C-terminale di 18 aminoacidi altamente conservata e mai evidenziata prima. Le verifiche tecnologiche, eseguite sugli impasti ottenuti a partire da farina di riso di linee transgeniche che esprimono i geni di alcune delle proteine di frumento e il gene dell'enzima transglutaminasi, dimostrano la capacità di queste di trattenere i gas prodotti dal lievito.

Bibliografia

1. Bean SR, Lookhart GL. Electrophoresis of cereal storage proteins. *J Chromatogr A* 2000;881:23-36.
2. Lahdeaho ML, Vainio E, Lehtinen M, Parkkonen P, Partanen J, Koskimies S, Maki M. Activation of celiac disease immune system by specific alpha-gliadin peptides. *Cereal Chem* 1995;72:475-9.
3. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000;18:53-81.
4. Shewry PR, Smith SJ, Lew EJ-L, Kasarda DD. *J Exp Bot* 1986;37: 633-9.
5. De Ritis G, Auricchio S, Jones HW, Lew EJ, Bernardin JE, Kasarda DD. In vitro (organ culture) studies of the toxicity of specific α -gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 1988;94:41-9.
6. Gupta RB, Paul JG, Cornish GB, Palmer GA, Bekes F, Rathjen AJ. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of Common Wheats. I. Its Addi-

tive and Interaction Effects on Dough Properties. *J Cereal Sci* 1994;19:9-17.

7. Shewry PR, Popineau Y, Lafiandra D, Belton P. Wheat glutenin subunits and dough elasticity: findings of the EUROWHEAT project. *Trends in Food Science and Technology* 2001;11:433-41.

8. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-9.

9. Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology* 1998;9:204-10.

10. Schuppan D, Hahn EG. Biomedicine. Gluten and the gut-lessons for immune regulation. *Science* 2002;297:2218-20.



P